

Université de Montréal

**Présence de cellules souches neuronales dans la cicatrice
cardiaque suite à un infarctus du myocarde**

Par
Jessica Drapeau

Département de Physiologie
Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
M.Sc. en Physiologie

1^{er} Dépôt : 5 Juillet 2004
Dépôt final : 1^{er} octobre 2004



© Jessica Drapeau, 2004

W
4
U58
2004
v.123

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Présence de cellules souches neuronales dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde

Présenté par
Jessica Drapeau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques De Champlain

.....
Président-rapporteur

Angelino Calderone

.....
Directeur de recherche

Louis-Éric Trudeau

.....
Membre du jury

Résumé en français

La formation de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde (IM) représente une réponse physiologique essentielle à la prévention d'une éventuelle rupture ventriculaire. Des études récentes ont démontré que la guérison des tissus cutanés blessés était associée à une innervation neuronale, et que la peau contiendrait des cellules souches multipotentes capables de se différencier en cellules de la lignée neuronale. Ces observations nous ont donc poussé à aller voir si le recrutement des cellules souches neuronales (CSN) était un événement impliqué dans la formation de la cicatrice cardiaque suite à un IM. Des cellules souches neuronales exprimant la protéine nestin ont été identifiées au sein de la cicatrice cardiaque d'une semaine post-IM chez des rats mâles, de même que des cellules différenciées en astrocytes réactifs (caractérisés par la co-expression de glial fibrillary acidic protein et de vimentin) ainsi qu'en neurones matures (exprimant la neurofilament-M et la peripherin). L'ARNm de la tyrosine hydroxylase a également été détecté dans la cicatrice, alors que la protéine a pu être détectée dans des neurones exprimant la peripherin. De plus, des cellules neuronales exprimant la myelin oligodendrocyte specific protein ont également été identifiées, reflétant la présence du phénotype oligodendrocytaire. Le surnageant récolté d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-IM a également induit la différenciation des cellules PC12, confirmant la sécrétion de facteurs neurotrophiques par ces cellules. En effet, le nerve growth factor (NGF) et le brain-derived neurotrophic factor ont été identifiés dans les myofibroblastes et les cellules neuronales, de même que les deux types de récepteurs au NGF trkA et p75. Ces résultats ont permis de mettre en évidence un recrutement de cellules souches neuronales lors de la formation de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde, lequel pourrait représenter un événement physiologique essentiel impliqué dans la réparation cardiaque.

Résumé en anglais

Scar formation post-myocardial infarction (MI) represents an essential physiological response to prevent ventricular rupture. Studies have shown that cutaneous wound healing was associated with neuronal innervation, and the skin contains multipotent stem cells capable of differentiating to neural cell types. These observations prompted us to examine whether neural stem cells recruitment occurred during scar formation post-MI. Nestin-expressing neural stem cells were isolated from the scar of 1-week post-MI male rats and differentiated to reactive astrocytes (co-expression of glial fibrillary acidic proteins, and vimentin), and neurofilaments-M- and peripherin-positive neurons. Tyrosine hydroxylase mRNA was detected in the scar and protein expression in peripherin-positive neurons. Cells expressing myelin oligodendrocytes specific protein were also identified delineating an oligodendrocyte phenotype. The supernatant harvested from scar-derived cells induced PC12 cell differentiation confirming the presence of neurotrophic factors. Nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor were identified in myofibroblastes and neural cells, and both expressed the NGF receptors trkA and p75. These data highlight the novel observation that neural stem cell recruitment occurs during scar formation post-MI and may represent a requisite physiological event of cardiac repair.

Table des matières

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	IV
RÉSUMÉ EN ANGLAIS	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
LES REMERCIEMENTS	0
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	2
1.0 Introduction.....	3
1.1 Infarctus du myocarde et remodelage cardiaque.....	5
1.2 Remodelage cardiaque.....	6
1.3 Blessure tissulaire et cicatrisation cutanée	8
1.3.1 Inflammation.....	9
1.3.2 Réparation tissulaire.....	10
1.3.3 Remodelage.....	13
1.4 Cicatrice cutanée VS Cicatrice cardiaque	15
1.5 Les Neurotrophines.....	17
1.5.1 Nerve Growth Factor (NGF).....	17
1.5.1.1 Structure	18
1.5.1.2 Récepteurs au NGF : TrkA ^{NGFR}	21
1.5.1.2.1 Signalisation de TrkA ^{NGFR} : la voie de Ras.....	22
1.5.1.2.2 Signalisation de TrkA ^{NGFR} : la voie de PI3-K.....	23
1.5.1.2.3 Signalisation de TrkA ^{NGFR} : la voie de PLC- γ	23
1.5.1.3 Récepteurs au NGF : p75 ^{NTR}	25
1.5.1.3.1 Rôle de p75 ^{NTR} : modulation de l'activité de TrkA	26
1.5.1.3.2 Signalisation de p75 ^{NTR} : la voie de NF κ B	28
1.5.1.3.3 Signalisation de p75 ^{NTR} : la voie Jun kinase	29
1.5.1.3.4 Signalisation de p75 ^{NTR} : la voie des céramides.....	29
1.5.1.4 Sources de NGF	31
1.5.1.5 Biosynthèse du NGF	32
1.5.1.6 Rôles du NGF	34
1.5.1.6.1 Rôles du NGF au niveau neuronal.....	34
1.5.1.6.2 Rôles de NGF dans l'inflammation	36
1.5.1.6.3 Rôles de NGF dans la fibrose, la guérison tissulaire et l'angiogénèse	37
1.5.2 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).....	39

1.6 Neurones et cellules gliales	41
1.6.1 Neurones	42
1.6.1.1 Marqueurs propres aux neurones	43
Neurofilaments	43
Peripherin	43
GAP-43	44
1.6.2 Cellules gliales	44
1.6.2.1 Les astrocytes	45
1.6.2.1.1 Marqueurs spécifiques aux astrocytes	48
Vimentin	48
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	49
S-100	49
1.6.2.2 Les Oligodendrocytes	50
1.6.2.2.1 Marqueurs spécifiques aux oligodendrocytes	52
Myelin-oligodendrocyte specific protein (MOSP)	52
Myelin basic protein (MBP)	53
1.6.2.3 Les microglies	53
1.6.2.4 Cellules de Schwann	54
1.6.2.5 Cellules épendymaires	56
1.6.3 Rôles du NGF dans l'innervation de la cicatrice cutanée	57
1.6.4 Rôle de l'innervation de la cicatrice dans la guérison tissulaire	58
1.7 Cellules Souches Neuronales	59
1.7.1 La nature des cellules souches neuronales	59
1.7.2 Source des cellules souches neuronales	60
1.7.3 Identification des cellules souches neuronales	60
1.7.4 Différents types de cellules souches et leurs marqueurs membranaires	61
1.7.5 Plasticité des cellules souches	62
1.7.6 Implication des cellules souches dans la réparation tissulaire	64
1.7.6.1 Cellules souches pluripotentes au niveau des muscles squelettiques	65
1.7.6.2 Facteurs pouvant induire la différenciation des cellules souches	66
1.7.6.3 Facteurs pouvant stimuler la migration des cellules souches dans un tissu cible	66
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	68
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	69
2.1 Culture cellulaire	70
2.1.1 Culture des fibroblastes cardiaques cicatriciels de rats	70
2.1.2 Culture des cellules de phéochromocytome (PC12) et traitement avec le surnageant de la culture de cellules cicatricielles de passage primaire	71
2.1.3 Culture des fibroblastes NIH 3T3	72
2.2 Immunofluorescence	72
2.2.1 Cellules en culture	72
2.2.2 Préparation et marquage des coupes tissulaires de cœur (Cryostat)	74
2.3 Analyse de l'expression du NGF par Immunobuvardage	75
2.4 Mesure par ELISA du NGF sécrété par une culture de cellules cicatricielle d'une semaine post-infarctus	77
2.5 Mesure de l'ARNm par RT-PCR	77

CHAPITRE 3 RÉSULTATS 78**3.1 Première partie : Caractérisation d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus. 78**

Figure 3.1 : Cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus 79

Figure 3.2 : *Myofibroblastes présents dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus d'une semaine.* 81**3.2 Deuxième partie : Caractérisation de la population cellulaire ectopique (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus. 82**Figure 3.3 : *Expression du facteur de croissance neuronal (NGF) et du facteur de croissance dérivé du cerveau (BDNF) par une culture de cellules cicatricielles.* 83Figure 3.4 : *Expression des récepteurs au NGF Trk-A et p75.* 86Figure 3.5 : *Sécrétion de nerve growth factor (NGF) par une culture de cellules cicatricielles.* 88Figure 3.6 : *Différenciation des cellules PC12 et réorganisation de la protéine neuronale neurofilament-M (NF-M; 145 kDa).* 89Figure 3.7 : *Marquage spécifique de neurofilament-M (NF-M; 145 kDa).* 91Figure 3.8 : *Marquage spécifique de Peripherin.* 93Figure 3.9 : *Marquage de Growth-associated protein-43 (Gap-43).* 94Figure 3.10 : *Marquage spécifique de Glial-fibrillary acidic protein (GFAP).* 95Figure 3.11 : *Marquage spécifique de la Myelin-oligodendrocyte specific protein (MOSP).* 97Figure 3.12 : *Expression de la tyrosine hydroxylase dans les cellules neuronales au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine.* 98**3.3 Troisième partie : Origine des cellules neuronales : Caractérisation des cellules souches neuronales (CSN) 100**Figure 3.13 : *Expression de la protéine spécifique aux cellules souches neuronales Nestin.* 101Figure 3.14 : *Astrocytes réactifs.* 104Figure 3.15 : *Neurones à différents stades de différenciation.* 106**CHAPITRE 4 DISCUSSION 108****4.1 Première partie : Caractérisation d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus. 112****4.2 Deuxième partie : Caractérisation de la population cellulaire ectopique (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus. 114****4.3 Troisième partie : Origine des cellules neuronales : caractérisation des cellules souches neuronales (CSN) au sein de la cicatrice cardiaque. 124****CONCLUSION 128****DIRECTIONS FUTURES 129****RÉFÉRENCES 131****ANNEXE 149**

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure du NGF 7S.....	19
Figure 1.2 : Voie de signalisation des récepteurs Trk.....	22
Figure 1.3 : Voie de signalisation des récepteurs p75.....	28
Figure 1.4 : Implication du NGF dans la réparation tissulaire : NGF et fibroblastes.....	38
Figure 1.5 : Implication du NGF dans la réparation tissulaire : NGF et cellules endothéliales.....	39
Figure 1.6 : Structure du gène et de la protéine BDNF.....	40
Figure 1.7 : Synthèse, stockage et sécrétion du BDNF.....	41
Figure 1.8 : Origine, migration et différenciation des différents types de neurones et de cellules gliales dans le système nerveux des vertébrés.....	47
Figure 1.9 : Représentation schématique de la lignée oligodendrocytaire, montrant les sites d'action des signaux neuronaux ou astrocytaires.....	51
Figure 1.10 : Schéma des étapes de développement des cellules de Schwann.....	55
Figure 3.1 : Culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus.....	80
Figure 3.2 : Myofibroblastes présents dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus d'une semaine.....	81
Figure 3.3 : Expression du facteur de croissance neuronal (NGF) et du facteur de croissance dérivé du cerveau (BDNF) dans une culture de cellules cicatricielles.....	85
Figure 3.4 : Expression des récepteurs au NGF Trk-A et p75.....	87
Figure 3.5 : Expression de nerve growth factor (NGF) dans une culture de cellules cicatricielles.....	88
Figure 3.6 : Différenciation des cellules PC12.....	90
Figure 3.7 : Marquage spécifique de neurofilament-M (NF-M; 145 kDa).....	92
Figure 3.8 : Marquage spécifique de Peripherin.....	93
Figure 3.9 : Marquage de Growth-associated protein-43 (Gap-43).....	94
Figure 3.10 : Marquage spécifique de Glial-fibrillary acidic protein (GFAP).....	96
Figure 3.11 : Marquage spécifique de Myelin-oligodendrocyte specific protein (MOSP).....	97
Figure 3.12 : Expression de la tyrosine hydroxylase dans les cellules neuronales au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine.....	99
Figure 3.13 : Expression de la protéine spécifique aux cellules souches neuronales Nestin.....	103
Figure 3.14 : Astrocytes réactifs.....	105
Figure 3.15 : Neurones à différents stades de différenciation.....	107

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Médiateurs de l'inflammation	11
Tableau 1.2 : Comparaison entre la cicatrice cutanée et la cicatrice cardiaque ..	15
Tableau 1.3 : Différentes formes de NGF	34
Tableau 1.4 : Marqueurs membranaires spécifiques de différents types de cellules souches	62
Tableau 2.1 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence	75

Liste des abréviations

Akt/PKB: Protein kinase B	G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor
ANP : Atrial natriuretic peptide	GDNF: glial derived neurotrophic factor
ATP: Adénosine triphosphate	GFAP : Glial fibrillary acidic protein
ADP: Adénosine diphosphate	GFP: Green florescent protein
AMP(c) :Adénosine monophosphate (cyclique)	Grb-2 : Growth factor binding protein-2
ARN : Acide ribonucléique	GSK-3 β : Glycogen synthase kinase-3 β
ASK-1 : Apoptosis signal-regulating kinase-1	HBSS : Hank's balanced salt solution
AVC : Accident vasculaire cérébraux	HEP: High energy phosphate
BDNF: Brain derived neurotrophic factor	HSC : Hematopoietic stem cells
BNP : Brain natriuretic peptide	IGF : Insulin growth factor
BSA: Bovine serum albumine	I κ β : inhibitory kappa beta
C5a: Protéine du complément 5a	IKK : Inhibitor of I κ B kinase
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité	IL-1 -6 : Interleukine-1, -6, etc.
CNTF: Ciliary neurotrophic factor	IM : Infarctus du myocarde
CRD 1-4 : Cysteine-rich domain 1 à 4	IP3 : Inositol triphosphates
CREB: Cyclic-AMP Response Element Binding Protein	ITS : Insulin transferin selenium
CSPP: Cellules souches pluripotentes	JNK : C-Jun N-terminal Kinase
DABCO: 1.4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane	LIF: Leukemia inhibitor factor
DAG: Diacylglycerol	LTP: Long term potentiation
DD : Death domain	MAGE: Melanoma-associated antigen
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium	MAPK : Mitogen-activated protein kinase
DRG: Dorsal root ganglia	MAPKAP : Mitogen-activated protein kinase activated protein kinase
ECG: Électrocardiogramme	MBP: Myelin basic protein
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid	MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
EGTA: Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid	MEC: Matrice extracellulaire
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay	MOSP: Myelin-oligodendrocytes specific protein
ERK : Extracellular signal related kinase	MSC: Mesenchymal stem cells
FBS: Fetal bovine serum	MSG: Mouse submaxillary gland
FGF: Fibroblast growth factor	NF κ B: Nuclear factor κ B
FITC: Fluorescein-isothiocyanate	NF-M, -L, -H : Neurofilament-medium (145 kDa), -light (68kDa), -high (200kDa)
FRS-2: fibroblast growth factor (FGF) receptor substrates-2	NGF: Nerve growth factor
Gap-43: Growth associated protein-43	NIK: NF κ B-interacting kinase

NILV: Non-infarcted left ventricule
 NO: Nitrite oxide
 NRAGE: Neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue
 NILV: non-infarcted left ventricule
 NNVM: neonatal ventricule myocyte
 NRIF: Neurotrophin receptor interacting factor
 NT-3 -4: Neurotrophin-3, -4
 OPC: Oligodendrocyte progenitor cells
 P12: Plaque à 12 puits
 P100: Pétri de 100 mm²
 PC12: cellules de pheochromocytome
 PBS : phosphate buffered saline
 PDGF : Platelet-derived growth factor
 PDK-1 -2 : phosphatidylinositol 3,4,5-dependent kinase
 PI3-K: Phosphatidylinositol 3-kinase
 PLC: Phospholipase-C
 PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride
 PP-SCAR: primary passage scar
 RA: Retinoic acid
 Rsk : p90 ribosomal S6 kinase
 RT-PCR: Reverse transcriptase Polymerase chain reaction
 SC-1: Schwann cell factor-1
 SCF: Stem cell factor
 SCN : Cellules souches neuronales
 SDF-1: Stromal cell-derived factor-1
 SDS: Sodium dodecyl sulfate
 SMA : Smooth muscle α -actin
 SNC: Système nerveux central
 SNP: Système nerveux périphérique
 SOS: Son of Sevenless
 T75: Flacon de 75 cm²
 TGF- β 1 - β 3 : Transforming growth factor - β 1 - β 3
 TH : Tyrosine hydroxylase
 TNF- α : Tumor necrosis factor
 TNFR: Tumor necrosis factor receptor
 TRAF-6: TNFR-associated factor-6
 TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
 Tyr^X: Résidu tyrosine en position x
 VEGF : Vascular endothelium growth factor




Les remerciements

Quoi de mieux que d'avoir l'opportunité de mettre à l'œuvre un combo de confiance, de connaissance et d'imagination! Je dois énormément à l'homme qui m'a permis de travailler dans son laboratoire dans un climat de confiance et d'amitié, l'homme qui a eu l'audace de suivre mes hypothèses dans des domaines où nos connaissances étaient plutôt limitées (la neurologie et l'embryologie) ... Cette liberté m'a permis de pousser davantage mes connaissances, tout d'abord par intérêt, mais également par orgueil (je devais prouver que j'avais raison). Merci Lino d'avoir eu confiance, malgré l'image que tu avais de moi dans le cours d'Endocrino... À croire qu'il ne faut pas toujours se fier aux apparences, et que c'est en poussant un peu plus que l'on découvre des choses fantastiques! And remember Lino, I'm THE boss!!!

Gros merci aussi à la gang du lab et de l'ICM, sans qui ce cheminement n'aurait pas été aussi agréable! J'ai apprécié pouvoir combiner travail et vie sociale! Viv et Samar, merci de votre patience, je sais que je déplace de l'air quand j'arrive en quelque part! Fugues et Bob, You're the best!!!! Bonne chance avec les futurs étudiants, je sais que la marche est haute après moi!!! Je vous aime tous, et je ne vous oublie pas!!!

Merci à ma famille, Pops, Mom et Te! Vous savez à quel point je vous aime et combien vous êtes importants pour moi!!!

Et finalement, gros Merci à tous mes amis qui ont su supporter mes humeurs quand ça allait bien et moins bien. Thanks Ju pour ta lecture! Je suis sûre que tu vas pouvoir ajouter cette expérience dans ton cv, juste après ton Bacc en Arts!



Le travail qui suit est le résultat d'une découverte faite par hasard, qui a piqué la curiosité de personnes déterminées à comprendre ce qui nous tient à cœur. Il ne s'agit par contre que du premier chapitre d'un très long récit, offrant un avant-goût de l'ampleur de son implication dans le domaine de la physiologie cardiaque. Ce travail résulte de l'intégration de plusieurs domaines d'études (cardiologie, neurobiologie et embryologie) démontrant l'importance de traiter le corps humain en tant que tout, et non comme un ensemble de systèmes indépendants. Ce travail s'adresse donc à des gens ouverts d'esprit, capable de dévier de leur ligne de pensées, de s'adapter à de nouvelles théories. Voici le début d'une grande aventure!

Bonne lecture

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.0 Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès pour plus du tiers de la population canadienne. On constate que l'infarctus aigu du myocarde et la cardiopathie ischémique deviennent de sérieux problèmes de santé à l'âge de 45 ans chez les hommes et de 55 ans chez les femmes. Par contre, elles ne touchent pas que les personnes âgées; en effet, elles sont la troisième cause de décès prématuré chez les moins de 75 ans. Les taux de mortalité attribuable à la cardiopathie ischémique et à l'infarctus du myocarde continuent de diminuer, mais les taux de mortalité attribuable aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) n'ont pas changé sensiblement au cours des dix dernières années. Comme le nombre des personnes âgées est en constante croissance au Canada depuis quelques années, on assiste à une hausse du nombre de décès attribuables à l'AVC et à la cardiopathie ischémique. Cette tendance devrait se poursuivre pendant les quinze prochaines années (Le nouveau visage des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada 2000, Santé Canada).

Puisqu'on connaît un accroissement du nombre de personnes âgées qui présentent un risque élevé de maladies cardiovasculaires (MCV), ceci fera augmenter le besoin de tous les services de santé requis pour traiter ces MCV efficacement - soins ambulatoires, hôpitaux de soins actifs et de soins chroniques, réadaptation, soins et soutien à domicile, produits pharmaceutiques, éducation sanitaire et autres interventions (Le nouveau visage des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada 2000, Santé Canada).

De plus, le taux de prévalence élevé des principaux facteurs de risque - tabagisme, sédentarité, hypertension, dyslipidémies, obésité et diabète - continue d'entretenir l'épidémie de MCV au Canada. On n'observe aucune amélioration sensible de la situation par rapport à ces facteurs. Ceux-ci varient en fonction du sexe, de l'âge et de la région. Des recherches récentes sur les causes sous-jacentes des MCV, qui se sont penchées sur les infections, les micronutriments, l'homocystéine et les oxydants ainsi que les gènes, pourraient ouvrir de nouvelles voies en matière de prévention.

Compte tenu de la situation actuelle, il est primordial de mieux comprendre les mécanismes qui sont à l'origine des maladies cardiaques, afin de trouver des traitements innovateurs et d'en améliorer la prévention.

1.1 Infarctus du myocarde et remodelage cardiaque

Un infarctus du myocarde (IM) est causé par un blocage permanent d'une artère coronaire. Suite à cette occlusion, on verra un arrêt dans l'apport en oxygène et nutriments, ainsi que la « clearance » des déchets. L'absence d'oxygène forcera alors les cellules à passer du mode énergétique aérobie (métabolisme énergétique incluant la β -oxydation) au mode anaérobie (glycolyse). Ce « shift » se fait en un laps de temps très court (moins de huit secondes). Les conséquences de ce changement sont importantes : le taux de production d'ATP va énormément diminuer et l'ADP va commencer à s'accumuler. Elle sera ensuite dégradée par l'adénylate kinase en AMP qui sera ensuite dégradé en adénosine, et diffusera dans le milieu extracellulaire, diminuant ainsi la réserve des nucléotides adénines nécessaire pour la synthèse de l'ATP. Les réserves de créatine phosphate, source de phosphate à haute énergie (HEP), vont également diminuer rapidement. Le lactate et les H^+ vont s'accumuler, ce qui aura pour effet de diminuer le pH intracellulaire à 5.8-6.0. Toute cette accumulation générera une augmentation de l'osmolarité intracellulaire, entraînant une entrée d'eau dans les cellules. On assistera également à une diminution du potentiel de membrane des cellules, induisant une modification de l'ECG. Conséquences : les contractions vont diminuer, favorisant davantage une élongation des myocytes plutôt qu'un raccourcissement.¹ Si la reperfusion n'arrive pas dans les 15 minutes suivant l'occlusion, les changements survenus dans le myocarde seront irréversibles et les conséquences sur les cardiomyocytes seront fatales (induction de la nécrose cellulaire).

1.2 Remodelage cardiaque

Le remodelage cardiaque est défini comme étant un processus par lequel le myocarde subit des changements structurels et fonctionnels suite à une blessure, tels un infarctus, une infection, une maladie valvulaire, une hypertension artérielle, ou simplement suite à l'adaptation à une situation physiologique excessive.² Il existe deux types de remodelage : tout d'abord, il y a le remodelage physiologique qui se traduit par des changements adaptatifs à une demande cardiaque accrue, causée, par exemple, par l'exercice physique intense ou la croissance. Ce processus est normal, et résulte en l'augmentation de la longueur de la paroi du cœur causée par l'hypertrophie excentrique des myocytes.

Il y a ensuite le remodelage pathologique, qui peut être causé par une hypertension artérielle, une surcharge volumique, une surcharge pressive, une régurgitation aortique, ou conséquemment à un infarctus du myocarde. La réponse à ces changements peut être d'ordre physiologique (compensatoire), ou pathologique, causant une diminution dans la fonction cardiaque.

Suite à un infarctus, et conséquemment à la mort des myocytes, on verra apparaître une réaction inflammatoire importante dans la zone infarctée. Cette inflammation est essentielle à la réparation tissulaire et donc à la survie du patient. Les radicaux libres produits et la cascade des protéines du complément étant activée, une cascade de cytokines et de chemokines sera enclenchée par le myocarde. IL-8 et C5a seront relâchés suite à l'ischémie et stimuleront le recrutement des neutrophiles. MCP-1

(monocyte chemoattractant protein-1) induira le recrutement des cellules mononucléaires (monocytes, macrophages, lymphocytes). L'accumulation de monocytes dérivants de la différenciation des macrophages ainsi que l'augmentation en nombre des mastocytes entraînera une très grande sécrétion de divers facteurs de croissance, stimulant l'angiogénèse, la migration et la prolifération des fibroblastes dans la zone infarctée, la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, en plus de participer à la phagocytose des cellules mortes.³ Il a également été démontré que certaines cytokines libérées pourraient participer au recrutement d'un certain type de cellules souches (blood-derived primitive stem cells) ayant un pouvoir limité de régénération du myocarde.⁴

L'augmentation du nombre de fibroblastes dans la zone infarctée est une étape très importante dans le remodelage cardiaque. Rapidement après l'infarctus (4-6 jours post-IM), ces cellules, sous l'influence d'un grand nombre de facteurs de croissance (principalement TGF- β 1 et 3) et de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, etc.), se différencieront en myofibroblastes, cellules exprimant la protéine d'actine- α du muscle lisse (Smooth muscle α -actin, SMA), lui conférant la propriété de se contracter.⁵ Ces cellules sont responsables d'une très grande production de protéines de la matrice extracellulaire (MEC), comprenant le collagène (type I et III), la fibronectine, les protéoglycans, la laminine et les collagénases, qui seront impliquées dans la formation de la cicatrice cardiaque.⁵ Cette étape de remodelage en phase aiguë fait partie intégrante du processus de fibrose réparative et est physiologique. On oppose ce phénomène à la fibrose réactive, qui constitue une déposition de protéines

de la MEC au niveau d'un myocarde non-infarci suite à une inflammation ou à une hypertrophie cardiaque concentrique, ou en phase chronique de l'hypertrophie eccentric, ayant pour conséquence de diminuer la fonction cardiaque.⁵ Puisque ce sont les myofibroblastes qui jouent un rôle central dans le processus de cicatrisation et de fibrose cardiaque, et que ces derniers restent de manière quasi-permanente (plusieurs années) dans le cœur,⁵ leur présence entraînera plusieurs conséquences à long terme. Elle entraînera une rigidité grandissante de la paroi du cœur à l'endroit de déposition des protéines, et accentuera l'hétérogénéité tissulaire du cœur, entraînant éventuellement des problèmes de contractilité et aboutira éventuellement à une défaillance cardiaque.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la régulation de la fibrose cardiaque. Les principaux stimulants sont l'angiotensine II, l'aldostérone, l'épinéphrine, la norépinéphrine et l'endothéline I qui ont tous des effets stimulateurs sur la production de TGF- β , impliqué à son tour dans la fibrose,⁵ tandis que l'ANP, le BNP et le NO joueraient plutôt des rôles d'inhibiteurs de la fibrose. La balance entre les facteurs pro-fibrotiques et antifibrotiques déterminera l'amplitude du remodelage cardiaque.

1.3 Blessure tissulaire et cicatrisation cutanée

Il existe plusieurs points communs entre la cicatrisation cardiaque et la cicatrisation cutanée. Voyons plus en détails le second type de cicatrisation.

La guérison tissulaire est un processus complexe dans lequel plusieurs interactions ont lieu entre les différentes cellules retrouvées au niveau du tissu (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules nerveuses), les différents composants de la MEC, les médiateurs chimiques et les cellules inflammatoires qui infiltrent le tissu blessé (leucocytes).

On peut définir la guérison tissulaire en trois grandes phases : l'inflammation, la réparation tissulaire, le remodelage.

1.3.1 Inflammation

L'inflammation aiguë est un processus au cours duquel le plasma et les leucocytes s'accumulent au site d'une lésion afin de circonscrire son étendue, d'y éliminer les agents bactériens (s'il y a lieu) et d'y débarrasser les cellules détruites. Il s'agit d'un processus non-spécifique (par opposition à l'inflammation chronique qui implique une réponse immunitaire spécifique) qui peut durer de quelques minutes à quelques jours.⁶ Les premiers événements rencontrés sont d'ordre hémodynamiques (changements dans le calibre des vaisseaux et du débit sanguin), suivi par une augmentation de la perméabilité vasculaire (exsudation accrue) entraînant une émigration massive des leucocytes au niveau du tissu lésé. Il a d'ailleurs été démontré que seulement une journée après la blessure, la population de leucocytes polymorphonucléaires (basophiles, mastocytes, éosinophiles et neutrophiles) constituerait environ 50% des cellules retrouvées dans le tissu lésé.⁶ Les monocytes/macrophages envahiront ensuite le site pour entamer le processus de phagocytose. On va également y retrouver des

lymphocytes, mais par contre, ceux-ci n'auront qu'un rôle de libérateur de facteur de croissance dans le processus d'inflammation aiguë, sans actions spécifiques.⁷

Tous les phénomènes rencontrés dans l'inflammation aiguë sont dépendants de la libération de médiateurs chimiques dans le tissu lésé. Un résumé des principaux médiateurs de l'inflammation est retrouvé au Tableau 1.1.

1.3.2 Réparation tissulaire

Cette étape va permettre la reconstitution des tissus blessés à leur état original, ou le remplacement du site lésé par une cicatrice riche en tissu conjonctif fibreux dense. Ce processus s'enclenche tôt après le début de l'inflammation, mais ne peut être complété que lorsque l'agent agresseur a été détruit ou totalement neutralisé. La réparation consiste essentiellement à remplacer les cellules mortes par des cellules vivantes, du tissu lésé par du tissu sain. Cette réparation anatomique des structures sera éventuellement suivie d'une réparation fonctionnelle impliquant un remodelage de la zone lésée et réparée.⁸

La réparation tissulaire peut se faire selon deux modes : la régénération et la cicatrisation.⁸ La régénération a lieu lorsque les cellules parenchymateuses mortes du tissu peuvent être remplacées par d'autres cellules du même type. Dans ce cas, le tissu lésé retrouve son intégrité anatomique et fonctionnelle. Dans le cas de la cicatrisation, on est en présence de cellules permanentes qui sont incapables de se reproduire

Tableau 1.1 : Médiateurs de l'inflammation (extrait de Réf. #8)

Tableau 1.1 : MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION				
Médiateur	Sources principales	Actions		
		Hyper perméabilité	Chimio-tactisme	Autres effets
Histamine	Mastocytes	+	-	Dilatation des artérioles
Sérotinine	Plaquettes	+	-	
Bradykinine	Plasma	+	-	Douleur
Complément				
C3a	Plasma	+	-	Effet opsonine (C3b)
C5a	Plasma	+	+	Activation des leucocytes
Prostaglandines (D,E,F)	Leucocytes et mastocytes	potentialisation	-	Douleur, fièvre
Leucotriènes				
B4	Leucocytes	-	+	Activation des leucocytes
C4, D4, E4	Leucocytes et mastocytes	+	-	Bronchoconstriction
PAF	Leucocytes, Mastocytes, Plaquettes, Endothélium.	+	+	Bronchoconstriction
Cytokines:				
IL-1 et TNF	Macrophages et lymphocytes	-	+	Activation endothéliale Effets systémiques
IL-8	Macrophages, Endothélium	-	+	Activation des leucocytes
NO (oxyde nitrique)	Endothélium Macrophages			Vasodilatation
Métabolites de l'oxygène	Leucocytes	+	+/-	Lésions tissulaires
Protéases neutres	Neutrophiles			Lésions tissulaires

(cardiomyocytes par exemple), et donc, suite à une lésion, ces cellules seront remplacées par des cellules stromales (essentiellement des fibroblastes), résultant en une perte de l'intégrité anatomique et de la fonction spécialisée du tissu atteint.

La cicatrisation a lieu en trois étapes : une première phase de démolition a lieu afin d'enlever les tissus morts. Cette phase comprend tout le processus inflammatoire aigu, ainsi que la phagocytose. Ensuite vient une phase active de remplacement tissulaire qui implique la prolifération cellulaire et la synthèse de nouveaux éléments tissulaires (protéines de la matrice extracellulaire). C'est durant cette phase que l'on retrouve le phénomène d'angiogénèse et de fibrogénèse.

L'angiogénèse est stimulée principalement par la relâche de facteurs angiogéniques par les macrophages.⁷⁻⁸ Ces derniers stimuleront les cellules endothéliales des veinules à se détacher de leur membrane basale et à migrer au site de blessure et à créer un tissu de granulation très vascularisé. De plus, cette vascularisation sera essentielle pour la survie des myofibroblastes, qui migreront en grand nombre au niveau du site de lésion.

La fibrogénèse, quant à elle, comprend la synthèse active de collagène, de glycosaminoglycane, de fibrine et de fibronectine. Cette synthèse est principalement faite par les myofibroblastes (cellule ayant une très forte expression de la protéine SMA)⁹ qui sont en constante infiltration dans la zone lésée. Cette synthèse durera jusqu'à ce que la MEC soit adéquate pour la régénération du lit épithélial.⁷

Beaucoup de facteurs pro-fibrogéniques sécrétés proviennent des cellules inflammatoires présentes au niveau du site de la blessure. En effet, les éosinophiles et les mastocytes sont connus pour avoir une influence directe sur les fibroblastes quant à la modulation de leur phénotype pro-fibrogénique (tant au niveau de la prolifération que de la production et de la contraction du collagène via la synthèse d'histamine, de tryptase et de TGF- β).¹⁰

1.3.3 Remodelage

Cette phase arrive en dernier lieu, et implique l'arrêt de la prolifération active des cellules stromales, l'involution des structures transitoires (néo-vaisseaux) en leur remplacement final par du tissu fibreux dense cicatriciel (avec modification dans l'orientation des fibres de collagène déjà existantes), acellulaire et avasculaire. De plus, la synthèse de collagène diminuera et celle de la collagénase augmentera proportionnellement afin de créer une balance entre sa synthèse et sa dégradation. La résistance tensile du tissu cicatriciel continuera d'augmenter progressivement durant la maturation de la cicatrice mais n'atteindra guère plus de 70-80% de celle du tissu original. On verra également une contraction de la plaie, due principalement aux propriétés contractiles des myofibroblastes. L'ampleur de la contraction peut même aller jusqu'à 70%.⁸

Pour mettre fin au processus de cicatrisation, on doit avoir éliminé tous les stimuli externes à l'inflammation, sans quoi cette dernière persistera et résultera en l'amplification des dommages tissulaires. Au niveau de la peau, la réépithélialisation

est nécessaire pour mettre fin à ce processus. Plusieurs facteurs sont impliqués dans cette involution : le facteur dérivé des cellules épidermales (epidermal cell-derived factor) serait responsable de la diminution de la prolifération active des fibroblastes; TGF- β 1 serait quant à lui impliqué dans la régression de l'inflammation, mais aurait également des effets profibrogéniques; TGF- β 3 aurait des effets anti-fibrotiques; Interferon- γ et α 2b seraient, quant à eux, impliqués dans la diminution de l'hypertrophie cicatricielle via la diminution de l'activité de TGF- β 1.

Ensuite, devra suivre le processus d'involution des structures transitoires et l'élimination des différentes populations cellulaires impliquées dans la guérison cicatricielle. On connaît trois mécanismes possibles qui permettent d'éliminer une population cellulaire : la nécrose cellulaire, l'émigration et l'apoptose. Il n'est pas bien connu encore par quel mécanisme cette étape aurait lieu; par contre, l'hypothèse de la nécrose est rapidement éliminée, puisque cette dernière induit l'inflammation⁷ qui est, dans le cas présent, en régression. Quant à l'émigration, cette hypothèse a également été éliminée, puisque ce mécanisme serait inefficace et très coûteux en énergie. De plus, il y a peu d'évidences démontrant des populations cellulaires quittant la région cicatricielle.⁷ Enfin, l'hypothèse la plus logique pour éliminer les populations cellulaires serait l'apoptose. En effet, les cellules inflammatoires impliquées dans la guérison tissulaire disparaîtront sans induire d'inflammation; une fois que les taux de collagène nécessaire à la cicatrice sont présents, les fibroblastes disparaîtront à leur tour par apoptose, de même que les cellules endothéliales impliquées dans la formation de néovaisseaux.

1.4 Cicatrice cutanée VS Cicatrice cardiaque

Voici un tableau comparatif (tableau 1.2) des deux types de cicatrice précédemment présentées.

Tableau 1.2 : Comparaison entre la cicatrice cutanée et la cicatrice cardiaque

■ Cicatrice cutanée	■ Cicatrice cardiaque
<ul style="list-style-type: none"> ■ Non-permanente ■ Cellules inflammatoires ■ Angiogénèse ■ Myofibroblastes (disparaissent avec perte de la cicatrice) ■ <u>NGF</u> ■ <u>Innervation de la cicatrice</u> ■ <u>Cellules souches</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Permanente ■ Cellules inflammatoires ■ Angiogénèse (insuffisante, donc conserve un milieu hypoxique) ■ Myofibroblastes (restent dans la cicatrice de façon permanente) ■ <u>NGF ?</u> ■ <u>Innervation de la cicatrice ?</u> ■ <u>Cellules souches ?</u>

Ces deux processus de cicatrisation sont comparables en plusieurs points (inflammation, populations cellulaires infiltrées), mais s'opposent diamétralement en ce qui a trait à certains autres. En effet, on ne peut passer outre le fait que la cicatrice cardiaque reste de manière permanente au niveau du coeur, ce qui impliquera énormément de conséquences à long terme, par opposition à la cicatrice cutanée qui disparaît une fois que le tissu est guéri. De plus, puisque que le cœur est un organe extrêmement bien perfusé en situation normale et que sa cicatrice est maintenue dans un stade d'hypoxie aiguë due à une perfusion inadéquate suite à un IM (malgré la

présence d'angiogénèse),¹¹ les conséquences pourront également être notables à ce niveau et générer des différences majeures entre les deux modèles cicatriciels. En effet, l'environnement particulier retrouvé au niveau de la cicatrice cardiaque ne sera que transitoire au niveau de la cicatrice cutanée. Puisque les myofibroblastes ne quitteront jamais le tissu cicatriciel du cœur, leur présence permanente aura des conséquences importantes sur les taux de synthèse de protéines de la MEC, ce qui aura des implications à long terme dans le développement de la fibrose cardiaque, puis éventuellement de l'insuffisance cardiaque.

Il a été démontré par le groupe de Vracko et al.¹⁴⁶ que suite à la formation d'une cicatrice cardiaque suivant une blessure (via ischémie ou engelure transdiaphragmatique), il y a une régénération des axones détruites par la blessure, une prolifération des cellules de Schwann entourant ces fibres entraînant ainsi une augmentation de la densité de ces fibres dans la zone blessée par rapport au reste du tissu sain. Ils ont également observé une forte synthèse de granules neurosécrétoires dans ces fibres régénérées. Le rôle fonctionnel de ces fibres nerveuses dans la cicatrice reste par contre à déterminer, bien qu'une relation ait été établie entre l'infarctus du myocarde, la formation de cicatrice post-IM et l'arythmogénèse cardiaque.

1.5 Les Neurotrophines

Il a été démontré par l'équipe du Dr Peter Smith¹² que les myofibroblastes seraient responsables d'une très grande sécrétion de neurotrophines, et plus précisément du facteur de croissance neuronal (Nerve Growth Factor; NGF), qui aurait pour effet d'accentuer la croissance et l'invasion de cellules neuronales dans la cicatrice cutanée, favorisant une cicatrisation beaucoup plus rapide et efficace, mais la présence de NGF ainsi que son action sur les fibres nerveuses n'a jamais été démontré dans la cicatrice cardiaque. Voyons tout d'abord ce que sont les neurotrophines.

Initialement, les neurotrophines étaient considérées comme des facteurs de survie neuronale, puis on leur attribua une grande variété d'actions tant dans la régulation neuroblastique, dans la prolifération des cellules de la crête neurale, dans la régulation de la neuritogénèse, dans la modulation des propriétés synaptiques, du maintien de la survie ainsi que de l'induction de l'apoptose.¹³ En plus de ces rôles physiologiques, les neurotrophines ont été impliquées dans plusieurs maladies neurologiques, incluant l'Alzheimer, le Parkinson, l'épilepsie ainsi que certains cancers du système nerveux central.

1.5.1 Nerve Growth Factor (NGF)

Le NGF a été découvert dans les années 1950 par Rita Levi-Montalcini avec la collaboration de Stanley Cohen, tous deux récipiendaires d'un prix Nobel en 1985 pour cette découverte. Ils ont trouvé que cette protéine pouvait stimuler la croissance et la différenciation des neurones sympathiques et sensoriels, ce qui fait de cette

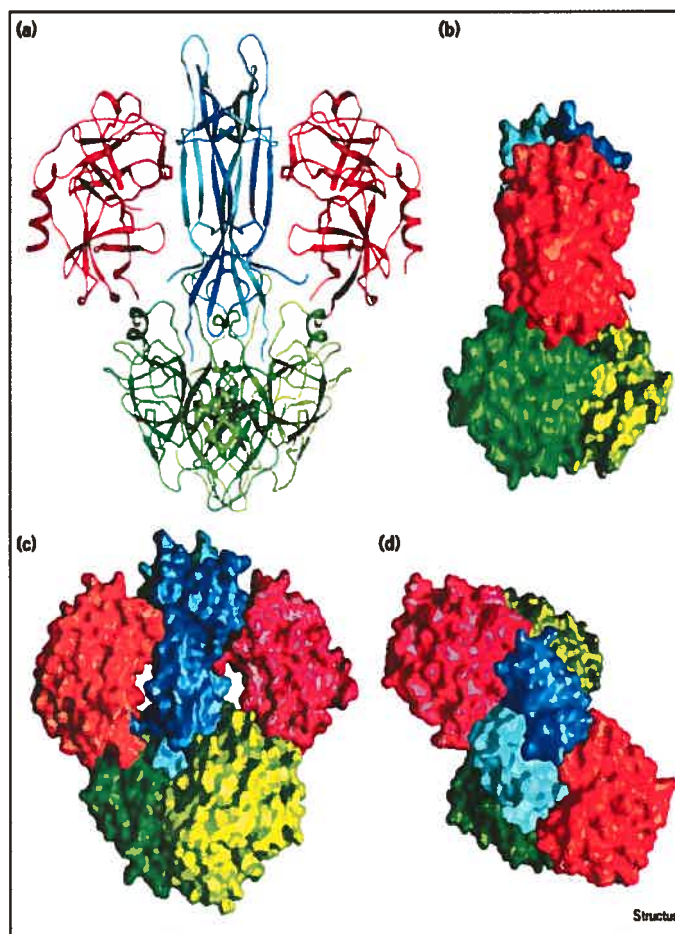
protéine un membre typique de la famille des neurotrophines, comprenant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain-Derived Neurotrophic Factor ; BDNF), et les neurotrophines NT-3 et NT-4/5.

1.5.1.1 Structure

Le NGF à haut poids moléculaire est un complexe protéinique de 140 000 daltons ayant un coefficient de sédimentation de 7S.¹⁴ Il est principalement retrouvé dans la glande sous-maxillaire de souris. Ce peptide est composé de trois types de sous-unité : une sous-unité β , deux γ , et deux α (voir figure 1.1 : Structure de NGF 7S). La sous-unité β , qui est la plus étudiée des trois, est responsable de la croissance neuronale. On retrouve cette sous-unité sous forme dimérique (deux chaînes identiques composées de 118 acides aminés¹⁶), lié au complexe 7S de manière non-covalente. Elle a un poids moléculaire de 26 000 daltons et un coefficient de sédimentation de 2.5S. Il a été démontré par Frazier et al.¹⁷ et par Stach et Shooter¹⁸ que tant les monomères que les dimères sont biologiquement actifs. Chaque chaîne contient 3 chaînes internes liées par des ponts disulfures qui sont essentiels, sans lesquelles l'activité de la protéine serait nulle. Ce sont les résidus tryptophanes qui semble être responsables de cette activité biologique,¹⁹ car son oxydation au niveau de Trp-21 rend le NGF inactif. Son point isoélectrique est de 9.4, la rendant la plus basique des trois sous-unités.

Figure 1.1 : Structure du NGF 7S (extrait de Réf. # 15)

Structure totale du NGF 7S (a) Modèle en ruban et (b-d) modèles compacts représentant les interactions entre les sous-unités du NGF. Le dimère NGF- β (la sous-unité $\beta 1$ en bleu pâle et $\beta 2$ en bleu foncé) est situé au centre avec les sous-unités α en rouge et les sous-unités γ en vert. Les interactions entre les sous-unités $\gamma 1$ et $\alpha 1$ (et $\gamma 2$ et $\alpha 2$) sont dues aux ions zinc (sphères blanches). La figure (a) a été dessinée avec SETOR et (b-d) avec GRASP.



La sous-unité γ est synthétisée à partir du gène *mGK-3*.²⁰ On retrouve deux sous-unités γ (poids moléculaire de 26 000 daltons chaque, toutes deux glycosylées) dans le complexe 7S. Cette sous-unité aurait une activité protéolytique intrinsèque responsable de la maturation du NGF- β en sa forme active. En effet, sa liaison en son site actif en C-terminal du NGF- β permet le clivage et la libération de deux résidus arginine. Cette liaison rend la sous-unité γ inactive et stabilise du même coup le complexe 7S. Sa séquence en acides aminés et en nucléotides la classe dans la famille des kallikréines. Six différents isoformes de cette sous-unité ont été identifiés.²¹⁻²²

Outre leur hétérogénéité électrophorétique et leur stabilité légèrement variable, ils conservent tous la même activité enzymatique.²³ Son point isoélectrique est de 5.2 à 5.8.¹⁶ On ne retrouve pas cette sous-unité dans tous les tissus et espèces synthétisant le β -NGF. Pourtant, ces tissus ont conservé la capacité de former du β -NGF mature, suggérant qu'il existerait d'autres enzymes capables de jouer le même rôle que la sous-unité γ . D'ailleurs, il a été démontré que la trypsine aurait la capacité de transformer correctement le précurseur du NGF- β .²⁴⁻²⁵

Pour ce qui est de la sous-unité α , elle est synthétisée à partir du gène *mGK-4*.²⁰ Elle a un point isoélectrique allant de 4.1 à 4.6, la rendant la plus acide des trois sous-unités. On connaît quatre formes différentes de sous-unité α qui ont toutes le même site de liaison à la sous-unité β . La sous-unité α a une très grande homologie avec la sous-unité γ et fait aussi partie de la famille des kallikréines, mais n'a pour sa part aucune activité enzymatique, probablement à cause de la variance dans sa séquence d'acide aminés en N-terminal²⁶ par rapport à celle retrouvée dans la sous-unité γ . On ne connaît pas précisément la fonction de cette sous-unité, par contre, on lui confère un rôle commun avec la sous-unité γ de protection du β -NGF contre une dégradation protéolytique^{27, 28, 29}, ainsi qu'un rôle de régulateur des activités biologiques du complexe 7S. Elle est, tout comme la sous-unité γ , glycosylée. Elle se lierait pour sa part à l'extrémité N-terminal du NGF.

En plus du complexe NGF à haut poids moléculaire (7S), on peut retrouver d'autres formes de NGF avec des coefficients de sédimentation différents, tels que le 4.3S (de

composition inconnu jusqu'à présent) ainsi que le 2.5S (quasi-identique au β -NGF, avec de légères différences en C- et N-terminal,³⁰ isolé de la dissociation du complexe 7S à la fin de la procédure de purification).

1.5.1.2 Récepteurs au NGF : TrkA^{NGFR}

TrkA est un membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase avec TrkB, TrkC et TrkE qui lie préférentiellement le NGF. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de Type I, comprenant 5 domaines extracellulaires (deux régions riches en cystéine (domaines 1 et 3) séparés par une région riche en leucine (domaine 2), suivi par deux domaines IgG-like (domaines 4 et 5) dans la région juxtamembranaire), un domaine transmembranaire, et deux domaines intracellulaires (un domaine kinase et une queue C-terminale). C'est le domaine extracellulaire 5 qui serait responsable de la liaison aux neurotrophines tandis qu'on attribuerait un rôle de modulateur de l'interaction ligands-récepteurs au domaine 2. Sa liaison avec une molécule de NGF entraîne la dimérisation des récepteurs, suivi de leur activation par l'autophosphorylation des résidus tyrosines Tyr⁴⁹⁰, Tyr⁶⁷⁰, Tyr⁶⁷⁴, Tyr⁶⁷⁵, Tyr⁷⁵¹ et Tyr⁷⁸⁵ du domaine cytoplasmique de chacun des récepteurs, activant par la suite plusieurs molécules impliquées dans différentes cascades de signalisation. Trois grandes voies de signalisation sont activées par Trk-A et jouent un rôle important dans la survie, la croissance et la différenciation neuronale : les voies de Ras, de PI3-K et PLC- γ (réf. figure 1.2).

Figure 1.2 : Voie de signalisation des récepteurs Trk (extrait de Réf. #31)

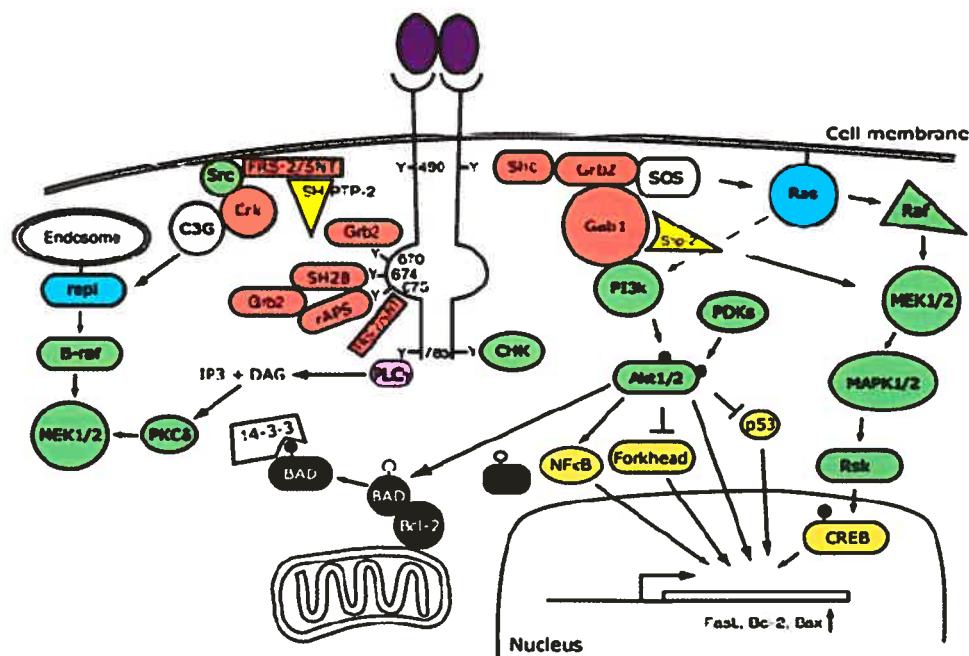


Figure 1.2 Schéma illustrant les voies signalétiques médiées par les récepteurs Trk.

La liaison des neurotrophines aux récepteurs Trk entraîne le recrutement de protéines qui auront des interactions avec les résidus phosphotyrosines du domaine cytoplasmique des récepteurs Trk. Ces interactions entraîneront l'activation de la cascade signalétique, incluant la voie de Ras, de phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) et de phospholipase C (PLC)- γ , et ultimement résultera en l'expression de plusieurs gènes, en l'activation de la survie neuronale ainsi que de la croissance des neurites. La nomenclature pour les résidus tyrosines du domaine cytoplasmique du récepteur Trk est basée sur la séquence humaine de TrkA. Dans ce diagramme, les protéines adaptateurs sont rouges, les kinases sont vertes, les petites protéines G sont bleues et les facteurs transcriptionnels sont jaunes.

1.5.1.2.1 Signalisation de $TrkA^{NGFR}$: la voie de Ras

Cette voie régulerait la survie et la différenciation neuronale grâce à l'activation des voies MAPK / ERK. En effet, la phosphorylation de la Tyr⁴⁹⁰ entraîne le recrutement et la phosphorylation de la protéine Shc, puis du complexe protéinique Grb-2 et SOS, activant conséquemment la protéine Ras. Elle stimulera pour sa part la voie de PI3-K, celle de p38MAPK / MAPKAP-2 ainsi que celle de c-raf / ERK. L'activation subséquente de Rsk (p90 ribosomal S6 kinase) et la phosphorylation de CREB par Rsk et p38MAPK seront les voies importantes activées pour favoriser la survie neuronale.^{13, 31}

1.5.1.2.2 Signalisation de TrkA^{NGFR} : la voie de PI3-K

Cette voie serait la voie principale impliquée dans la survie des neurones. Elle serait activée de manière dépendante (voie majeure) et indépendante de Ras (via Gab-1). L'activation de PI3-K entraînerait le recrutement à la membrane de PDK-1 et -2 responsables de la phosphorylation de la protéine kinase Akt / PKB qui est directement impliquée dans la survie neuronale par son action directe sur plusieurs substrats (Bcl-2, Caspase-9, IκB kinase, GSK-3β ainsi que plusieurs membres de la famille des facteurs de transcription Forkhead) bloquant conséquemment la voie principale de l'apoptose neuronale, JNK / p53 / Bax.^{13, 31, 32}

1.5.1.2.3 Signalisation de TrkA^{NGFR} : la voie de PLC-γ

On doit l'activation de la PLC-γ à sa phosphorylation causée par le résidu Tyr⁷⁸⁵ phosphorylé situé à l'extrémité C-terminale du récepteur. L'enzyme active hydrolysera ensuite le phosphatidyl inositide en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Cette réaction produira par la suite une augmentation du calcium intracellulaire causée par l'IP₃ ainsi qu'une activation de PKCδ par le DAG, qui est pour sa part impliqué directement dans la croissance des neurites et dans l'activation de la cascade de ERK. Par contre, cette voie ne serait pas la seule à jouer ce rôle, car une mutation au niveau du résidu Tyr⁷⁸⁵ ne bloque pas ce phénomène.

En plus de l'activation de ces voies, les neurotrophines induiraient un réarrangement rapide du cytosquelette de la cellule via le récepteur TrkA. Cette réorganisation serait

principalement causée par une petite protéine G de la famille des Cdc-42 / Rac / Rho, qui régulerait la polymérisation de l'actine-F.

Il a été démontré par plusieurs groupes qu'une fois le NGF lié au récepteur TrkA, le complexe serait internalisé dans la cellule par endocytose.^{33, 34, 35} Il a également été démontré dans les cellules PC12 que l'internalisation serait effectuée via un mécanisme dépendant de la clathrine.^{36, 37} Cette internalisation déterminerait les voies de signalisation qui seront activées. En effet, les voies responsables de la différenciation cellulaire (voie de FRS-2 par Crk pour l'activation à long terme de la voie de MAPK ainsi que l'activation de B-raf et de la cascade ERK) seraient dépendantes de l'internalisation du complexe NGF-TrkA, sans quoi la différenciation n'aura pas lieu.³¹ PI3-K semblerait être grandement impliqué dans ce processus d'endocytose, puisque des inhibiteurs spécifiques réduiraient le transport rétrograde des complexes NGF-TrkA et affecteraient du même coup plusieurs voies de signalisation intracellulaires activées par le récepteur.

Plusieurs groupes suggèrent qu'il y aurait des récepteurs au NGF non seulement dans la membrane cytoplasmique, mais également dans la membrane nucléaire,^{38, 39} mais il s'agit d'une hypothèse controversée.⁴⁰ Par contre, les rôles exacts de ces récepteurs ne sont pas bien connus. Il a également été suggéré qu'il pourrait y avoir translocation directe du complexe NGF-TrkA de la membrane cytoplasmique vers le noyau, afin d'y initier une cascade de signalisation (dans le cas actuel : p42/p44 MAPK).⁴¹

1.5.1.3 Récepteurs au NGF : p75^{NTR}

Le récepteur p75 est un des 25 membres de la superfamille des récepteurs TNF grâce à sa région riche en cystéine au niveau de son domaine extracellulaire. Il lie tous les neurotrophines de manière non-spécifique avec approximativement la même affinité. Sa liaison avec le NGF mature et précurseur est de faible affinité ($K_d \sim 10^{-11}$), d'où son nom de récepteur NGF de basse affinité (low affinity NGF receptor). Contrairement aux autres membres de récepteurs TNF, le p75 tend à se dimériser plutôt qu'à se trimériser, à cause de sa tendance à agir comme co-récepteur de la tyrosine kinase. Son domaine extracellulaire est composé de quatre domaines de six cystéines (CRD1-4), chacun relié par trois intrachâînes de ponts disulfures. L'interaction avec les neurotrophines se ferait au niveau du CRD3. Ce récepteur n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque. En effet, son domaine intracellulaire est formé d'un Death Domain (DD) qui serait impliqué dans la cascade pro-apoptotique,¹³ où se lie plusieurs protéines adaptateurs impliquées dans les voies de signalisation suivantes : TRAFs (TNFR-associated factors), JNK, NF- κ B, et Src.

Ce récepteur serait principalement exprimé pendant le développement dans la majorité des cellules du système nerveux central (SNC), mais son expression serait ensuite limitée à quelques structures spécifiques du cerveau. On voit également son expression dans les premiers stades de développement du système nerveux sensoriel et autonome, expression qui est maintenue dans les fibres sympathiques et les neurones sensoriels. On retrouve également la présence de ce récepteur dans plusieurs types de cellules non-neuronales, telles que dans les cellules mésenchymateuses impliquées

dans le développement de plusieurs organes (reins, dents, poumons, muscles, rétine, glande surrénale, kératinocytes, mélanocytes, cellules stellaires du foie, etc.).¹³ Il est également possible de voir son expression dans des cellules qui n'exprimaient pas le récepteur initialement, suite à une blessure. Par exemple, les oligodendrocytes exprimeront ce récepteur suite à une blessure de la colonne vertébrale, de même que les cellules de Schwann après une section nerveuse.¹³

Le récepteur p75 joue deux grandes fonctions physiologiques : il module l'activité du récepteur Trk, et initie les cascades qui régulent la survie cellulaire et l'apoptose. Tout comme les récepteurs Trk, le complexe ligand-récepteur p75 doit être internalisé dans la cellule pour effectuer ses actions.

1.5.1.3.1 Rôle de p75^{NTR} : modulation de l'activité de TrkA

En premier lieu, on sait que chacun des récepteurs a la capacité de lier le NGF. Il a été démontré que la co-expression des deux récepteurs entraîne la formation d'un site de liaison au NGF de très haute affinité. En effet, le taux de liaison du NGF au récepteur TrkA augmente de 25 fois lorsqu'il est co-exprimé avec p75.⁴² Il existe deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : tout d'abord, p75^{NTR} agirait comme co-récepteur qui lierait le NGF et le concentrerait dans une région, ou le présenterait au récepteur à tyrosine kinase dans une conformation favorable à sa liaison. Dans ce cas, la liaison du NGF au p75 serait essentielle pour faciliter l'activation de TrkA en réponse à de très faible concentration de NGF. En deuxième lieu, on suggère que p75

aurait des effets allostériques sur TrkA, formant alors des sites de haute affinité pour NGF, favorisant par le fait même sa liaison.¹³ Ce serait les domaines transmembranaires et intracellulaires qui seraient responsables de la formation de ces sites, puisqu'il a été démontré que des récepteurs p75 mutant au niveau du domaine extracellulaire produiraient quand même les changements allostériques de TrkA.⁴³ Dans cette seconde hypothèse, la liaison du NGF au p75 n'est pas requise pour augmenter l'affinité de TrkA pour son substrat.

Il a été démontré dans les cellules PC12 que les deux types de récepteurs TrkA et p75 seraient localisés au niveau des cavéoles, région membranaire spécialisée où les molécules impliquées dans les voies de signalisation se concentrent. En effet, il y aurait un lien direct entre les deux types de récepteurs et la cavéolin-1, une composante des cavéoles.⁴⁴ Il est possible que cette dernière molécule stimule la formation du complexe récepteur-ligand.

Les mécanismes d'action de p75 ne sont pas encore très bien connus. On sait que dans les cellules qui co-expriment les deux récepteurs, la survie cellulaire médiée par TrkA semble être le signal dominant qui bloquerait la voie de l'apoptose médiée par p75. Ce serait, dans ce cas, la voie de PI3-K activée par TrkA qui bloquerait la production de céramide par p75.

Deux voies sont utilisées par p75 pour causer la mort cellulaire: il y a la signalisation pro-apoptotique de p75^{NTR} et l'inhibition de l'activité de survie cellulaire produite par TrkA d'une manière dépendante de p75^{NTR}. Ces deux voies sont généralement activées simultanément pour faciliter la mort cellulaire.

Les principales voies empruntées par p75 pour causer la survie cellulaire et l'apoptose sont les suivantes : activation de NFκB, activation de la voie Jun Kinase et la production de céramide via l'activation de sphingomyélinase (réf figure 1.3)

Figure 1.3 : Voie de signalisation des récepteurs p75 (extrait de Réf. #31)

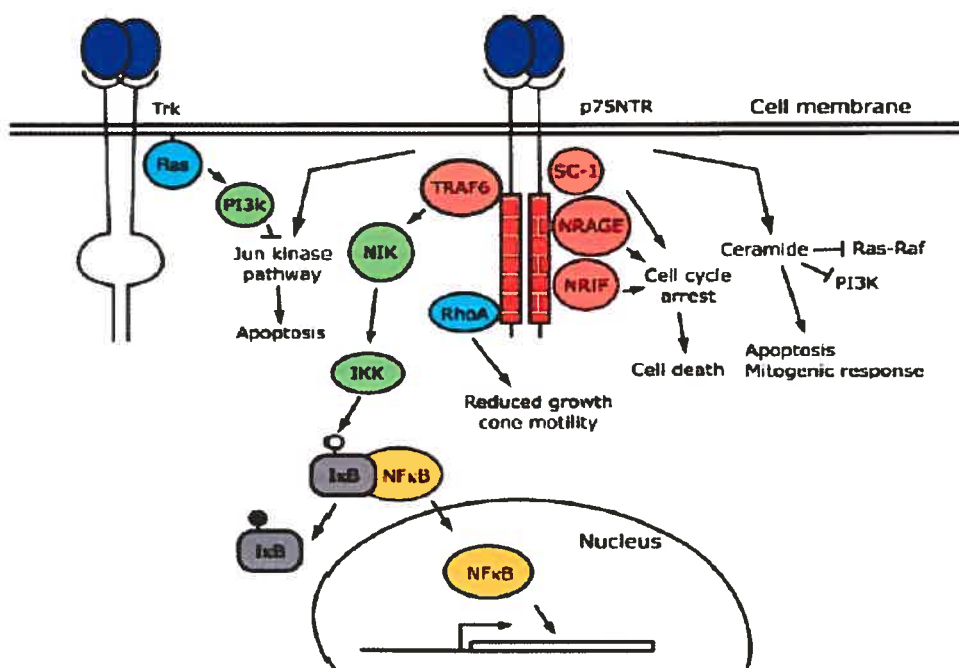


Figure 1.3 Schéma illustrant les voies de transduction signalétiques médiées par le récepteur p75NTR
 P75NTR interagit avec des protéines, incluant TRAF6, RhoA, NRAGE (neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue), SC-1, et NRIF, et régule l'expression génique, le cycle cellulaire, l'apoptose, les réponses mitogéniques et la motilité du cône de croissance. La liaison des neurotrophines au p75NTR peut également engendrer une activation de la voie des Jun kinases, qui peut être inhibée par l'activation de la voie des Ras-phosphatidylinositol-3-kinases (PI3-K) par les récepteurs Trk. Dans ce diagramme, les protéines adaptateurs sont rouges, les kinases sont vertes, les petites protéines G sont bleues et les facteurs transcriptionnels sont jaunes.

1.5.1.3.2 Signalisation de p75^{NTR} : la voie de NFκB

Cette voie promouvoit la survie cellulaire. La liaison de n'importe quelles neurotrophines au p75 stimule la liaison de la protéine adaptateur TRAF-6, qui activera

NIK (NFκB-interacting kinase), qui ira à son tour phosphoryler IKK (inhibitor of IκB kinase), ce qui permettra la phosphorylation de IκB. Cette dernière permettra la relâche et la translocation au noyau de NFκB qui régulera la survie cellulaire.³¹

1.5.1.3.3 Signalisation de p75^{NTR} : la voie Jun kinase

Cette voie est impliquée dans la régulation de l'apoptose. Le récepteur p75 va activer la voie JNK-p53-Bax d'une manière encore inconnue.^{31, 32} Ce sont les taux intracellulaires de p53 qui seraient déterminants dans le déclenchement de l'apoptose. Cette voie est inhibée par Ras et PI3-K/Akt provenant de l'activation du récepteur TrkA. L'activation supplémentaire de Cdc-42 par la cascade Jun kinase entraînera l'activation subséquente de ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) encore une fois impliquée dans la mort cellulaire.

1.5.1.3.4 Signalisation de p75^{NTR} : la voie des céramides

L'activation du récepteur p75 entraînera l'activation de la sphingomyélinase acide, résultant en la génération de céramides. Ces derniers promeuvent la voie de l'apoptose, mais ont également été impliqués dans le contrôle de réponses mitogéniques par leur contrôle de plusieurs voies de signalisation. En effet, les céramides inhibent la voie de ERK en se liant au Raf, causant des complexes Ras-Raf inactifs. Ils sont également responsables de l'inhibition de la voie de PI3-K de manière directe⁴⁵ et également de manière indirecte,⁴⁶ via la modification de

l'association de PI3-K au récepteur TrkA par une modification de l'expression de la cavéolin-1.³¹

Un autre rôle du complexe neurotrophine-p75 a été démontré dans le contrôle du cytosquelette. En effet, la liaison du ligand à son récepteur augmenterait directement la croissance des neurites. Il a été démontré que chez des embryons déficients en p75, les neurones sensoriels et moteurs s'étendraient moins vite vers leurs cibles par rapport aux contrôles.^{47, 48} En absence de neurotrophines, p75 active RhoA de manière tonique, réduisant la motilité des cônes de croissances. C'est grâce à la liaison des neurotrophines au récepteur que l'activation de RhoA est bloquée et que l'inhibition sur les cônes de croissances est enlevée. La présence de p75 serait également impliquée dans le transport rétrograde de NGF, BDNF et NT-4, et une réduction dans le transport rétrograde résulterait en une diminution de la croissance des neurites et de la survie cellulaire.

Plusieurs autres protéines se lient au récepteur p75 et sont décrites comme étant des protéines adaptatrices. NRIF (neurotrophin receptor interacting factor) est connu pour interagir avec les domaines juxtamembranaire et death domain (DD) du récepteur p75. On ne connaît pas très bien de quelle manière cette protéine serait impliquée dans le processus de mort cellulaire, mais son implication dans l'apoptose des neurones durant le développement a été démontré. On ne sait pas si sa liaison au récepteur est dépendante ou non des neurotrophines. Une autre protéine nommée NRAGE (neurotrophin receptor-interacting MAGE (melanoma-associated antigen) homologue)

a été reconnue pour s'associer avec p75^{NTR} et ainsi prévenir sa dimérisation avec TrkA. Ceci aura pour effet de stopper le cycle cellulaire et stimuler l'apoptose. SC-1 est également une protéine qui se lie avec le récepteur, et qui est ensuite redistribuée du cytoplasme vers le noyau pour stopper la croissance cellulaire. Plusieurs mécanismes restent encore à caractériser en ce qui a trait aux différentes voies impliquées dans la signalisation du récepteur p75.

On a vu que p75 jouait un rôle important dans la modulation de l'activité du récepteur TrkA, mais il existe aussi une régularité réciproque entre ces deux récepteurs. En effet, la présence de p75 est favorable à l'activité de TrkA, mais le contraire n'est pas vrai. Les neurotrophines sont beaucoup plus efficaces à induire l'apoptose via les récepteurs p75 en absence de récepteurs TrkA. L'activation de TrkA supprime la voie de Jun kinase, qui joue un rôle important dans le déclenchement de l'apoptose. TrkA activé abolirait également l'hydrolyse de la sphingomyéline, et du même coup la formation de céramide. Par contre, la signalisation de Trk n'inhibera pas l'induction de la cascade de NFκB par p75. Au contraire, son activation aura une contribution synergique avec celle de TrkA dans le processus de survie cellulaire.

1.5.1.4 Sources de NGF

La source exocrine de NGF la plus étudiée est la glande salivaire sous-maxillaire de souris mâles. En effet, ces derniers vont produire une très grande quantité de NGF dans la salive lors de combats avec d'autres mâles, suggérant que le NGF serait important comme moyen de défense de cette espèce.⁴⁹ D'autres sources exocrines de

NGF ont été identifiées : le venin de serpent,⁵⁰⁻⁵³ la prostate des cobayes,^{54, 55} le sperme et les vésicules séminales de taureaux,^{56, 57} ainsi que les glandes sous-maxillaires de rat africain *Mastomys natalensis*.^{58, 59} Il existe plusieurs autres sources endocrines de NGF, mais les quantités produites sont beaucoup plus petites. Cette source peut provenir des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des macrophages, des cellules gliales, des kératinocytes, des adipocytes, des cellules de Schwann, ainsi que des cellules sarcomateuses S-180.^{9, 49}

On retrouve une excellente conservation dans la séquence du NGF entre les différentes espèces, contrastant avec la faible réactivité immunologique croisée. Ceci serait causé principalement par de petites variances de résidus situés au niveau de sites antigéniques spécifiques.^{60, 61}

1.5.1.5 Biosynthèse du NGF

La synthèse du complexe 7S faite dans la glande sous-maxillaire de souris à lieu principalement dans les cellules du tubule granulaire convoluté. Elle est principalement induite chez cette espèce par les androgènes,⁶² ce qui implique une plus grande production chez le mâle par rapport à la femelle. La production est également induite chez cette espèce par la thyroxine. Il a été démontré que cette induction par les androgènes n'était pas retrouvée dans les autres tissus non reproducteurs de la souris, ainsi que dans les tissus des autres espèces.²⁴ La production de NGF peut également être régulée par la croissance, ainsi que par des blessures

tissulaires. La quantité de NGF retrouvée au niveau tissulaire est une conséquence du niveau de transcription.

Le gène du β -NGF de souris est situé sur le 3^e chromosome, tandis que celui de l'humain est situé sur le petit bras du chromosome 1. On retrouve une seule copie de ce gène, qui est composé de 5 exons séparés par 4 introns. Chez la souris, il a été démontré qu'il y avait deux ARNm majeurs (un long (A) et un court (B)) et deux ARNm mineurs (similaires aux ARNm majeurs; C long et D court) du β -NGF, résultant d'un épissage alternatif différent de l'ARNm.^{63, 64} Les deux précurseurs A et B ont la même séquence en 3', mais différent au niveau de leur extrémité 5', ce qui leur confère des poids moléculaires différents, soit 34 et 27 kDa respectivement. Le transcrit C est similaire au A, mais dérive d'un promoteur différent situé en amont du premier, et le transcrit D est similaire au B, mais à un intron en moins. Ces deux ARNm mineurs représentent moins de 1% des ARNm de NGF dans la glande sous-maxillaire, et 5-10% au niveau du cortex et du cœur, et sont quasi-indétectables dans les autres tissus.

Ces précurseurs sont considérés comme étant des pré-pro NGF. Ils seront par la suite traduits en précurseurs pro-NGF et subiront finalement une dernière modification aux extrémités N- et C-terminal pour former la protéine mature à 13.2 kDa.²⁴ On connaît trois sites potentiels de glycosylation : deux à l'extrémité N-terminal des pro-NGF et un au niveau de la protéine mature, mais ce dernier n'est que partiellement utilisé.⁶⁵ Une série de précurseurs ont été identifiés dans différents types cellulaires et sont

présenté au Tableau 1.3. On y retrouve une très grande variété dans les poids moléculaires intermédiaires, tout dépendant du degré de maturation du peptide, ainsi que de l'espèce chez laquelle il a été découvert.

Tableau 1.3 : Différentes formes de NGF

PM	Peptide	Références
73	prepro-NGF	66; 67
60	prepro-NGF	66; 67; 68
53	prepro-NGF modifié	66; 67; 69
42.5	Pro-NGF	70
39	Pro-NGF	70
35	Long précurseur (prepro)	70; 71; 73; 74
34	Long précurseur (prepro)	24; 25
32	Pro-NGF	24; 68; 75
30-31	Long précurseur (prepro)	72; 74; 76
28	Petit précurseur (prepro)	74
27	Petit précurseur (prepro)	24; 25; 73
25	Pro-NGF	24
24	Petit précurseur (prepro)	72
23	Pro-NGF partiellement mûré	66
22	Pro-NGF partiellement mûré	73; 76
16.5	mature	70
13.5	mature	70
13.2	mature	24
13	mature	68; 75
12.5	mature	71
12	Petit précurseur (prepro à 24 kDa) sans la fraction β	72

1.5.1.6 Rôles du NGF

1.5.1.6.1 Rôles du NGF au niveau neuronal

Le rôle le plus connu de ce facteur est celui de stimuler la survie et la différenciation des neurones sympathiques au stade embryonnaire. En effet, il a été démontré que le NGF est synthétisé en quantité limitée par les tissus cibles des neurones sympathiques pendant une phase critique du développement embryonnaire.⁷⁷ Les quantités synthétisées étant extrêmement faibles, seulement environ 50% de la population de

neurones sympathiques embryonnaires survivra, bien qu'ils aient tous atteint les organes cibles.

Le NGF n'agit pas seulement sur les neurones sympathiques, mais également sur les neurones nociceptifs (fibres C et A δ : touché et douleur) et corticaux (mémoire). Il n'a par contre aucun effet sur les motoneurones, les neurones parasympathiques ainsi que sur la quasi-totalité des neurones centraux.

En revanche, les neurones adultes ne seraient plus (ou beaucoup moins) sensibles au NGF.⁹⁶ Ceci implique que ces cellules requièrent la présence de ce facteur à une phase bien précise et critique du développement, sans quoi, en absence de NGF, la conséquence serait fatale. Par contre, il a été démontré par plusieurs groupes que tous les neurones dépendraient d'un support trophique venant de leurs tissus cibles, non seulement durant le développement, mais également dans le système nerveux adulte.³¹

Outre la présence ou l'absence de ce facteur, les quantités sécrétées sont très importantes dans la distribution des fonctions des différents neurones. En effet, au niveau des fibres sensibles, une trop faible synthèse de NGF peut modifier les propriétés des fibres A δ . Ces fibres vont normalement répondre à une stimulation mécanique à un haut seuil de stimulation. Une déficience postnatale en NGF entraînera une diminution dans le seuil de sensibilité de ces fibres, qui répondront à de plus faible stimulation mécanique (touché) plutôt qu'à la douleur. D'un autre côté, une trop grande synthèse en NGF (par exemple lors de l'insertion du gène NGF dans le promoteur du gène de kératine-14 de la peau) résultera en une plus grande survie des fibres A δ et C (de 65% à 97% pour ce qui est des fibres A δ et de 42% à 96% en ce

qui a trait aux fibres C), impliquant une diminution de la sensibilité aux stimuli mécaniques et une augmentation de la sensibilité aux stimuli thermiques.³¹

D'un autre côté, le NGF peut jouer un rôle chemoattractif ou chemorépulseur. Ces propriétés dépendent principalement des niveaux d'AMPC produit grâce à la cascade PI3-kinase.⁷⁸ Les hauts taux d'AMPC stimuleraient l'avancement des cônes de croissance des neurones sympathiques tandis que les inhibiteurs de la cascade d'AMPC et/ou de PI3-K agiraient plus comme chemorépulseurs. Ceci aura des implications dans le contrôle du développement des fibres vers les organes cibles.

1.5.1.6.2 Rôles de NGF dans l'inflammation

Plusieurs études ont démontré qu'un déséquilibre de NGF pourrait également jouer un rôle dans l'inflammation neurogène. En effet, plusieurs maladies inflammatoires démontrent des taux de synthèse de NGF beaucoup plus importants par rapport aux niveaux basaux. Ceci a été démontré dans les liquides synoviaux chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ou d'autres arthropathies inflammatoires,⁷⁹ mais également dans les cellules musculaires lisses bronchiales⁸⁰ impliquées dans l'asthme. Il a également été démontré que les taux plasmatiques de NGF peuvent être influencés par plusieurs maladies auto-immunes, troubles inflammatoires et fibrotiques et semblent être impliqués dans l'hyperalgésie.⁸¹

Plusieurs cellules immunitaires sont reconnues pour produire, relâcher et être influencées par le NGF : les mastocytes ont été les premières cellules non-neuronales

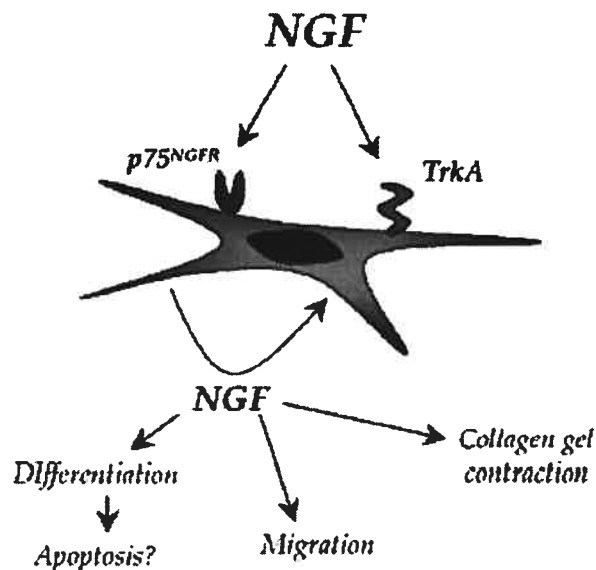
identifiées, suivi des basophiles, des lymphocytes B et T, des monocytes/macrophages et finalement tout récemment des éosinophiles (cellules clés impliquées dans les allergies). En plus de ces cellules, deux types cellulaires du tissu conjonctif auraient les mêmes propriétés: les fibroblastes et les kératinocytes.^{10, 81} Les effets autocrines et paracrines du NGF sur ces cellules ont de très grandes implications dans l'inflammation allergique, dans le développement de la fibrose, dans la guérison tissulaire, ainsi que dans l'angiogénèse retrouvée dans les lésions tissulaires. En effet, en plus de stimuler sa propre production, le NGF potentialiserait la synthèse et l'excrétion de plusieurs autres médiateurs chimiques, de même que l'expression des récepteurs respectifs.

1.5.1.6.3 Rôles de NGF dans la fibrose, la guérison tissulaire et l'angiogénèse

Le rôle direct du NGF dans la fibrose et la guérison tissulaire est de mieux en mieux défini grâce aux études de Kohyama et al.⁸², et de Micera et al.⁸³ (voir fig. 1.4). De faibles concentrations de NGF stimuleraient principalement la migration des fibroblastes du site lésé grâce à ses récepteurs TrkA, mais n'auraient que peu d'effets quant à la prolifération des fibroblastes, à la production de collagène ainsi qu'à la production ou activation de métalloprotéinases. Le NGF stimulerait également la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et induirait l'expression de la protéine SMA dans ces dernières, favorisant la contraction de la plaie.^{82, 83, 84} Ces résultats ont été obtenus dans les fibroblastes de la peau ainsi que dans ceux retrouvés dans les poumons. Son implication serait plus importante au début et à la fin du processus de réparation tissulaire. En effet, une exposition persistante au NGF

induirait l'expression des récepteurs à faibles affinités p75, qui seraient impliqués dans l'apoptose des myofibroblastes, mettant ainsi fin au processus de guérison tissulaire. De plus, d'autres études ont démontré que le NGF tendrait à augmenter le degré de réépithélialisation, l'épaisseur du tissu de granulation, ainsi que la densité de la MEC.⁸⁵

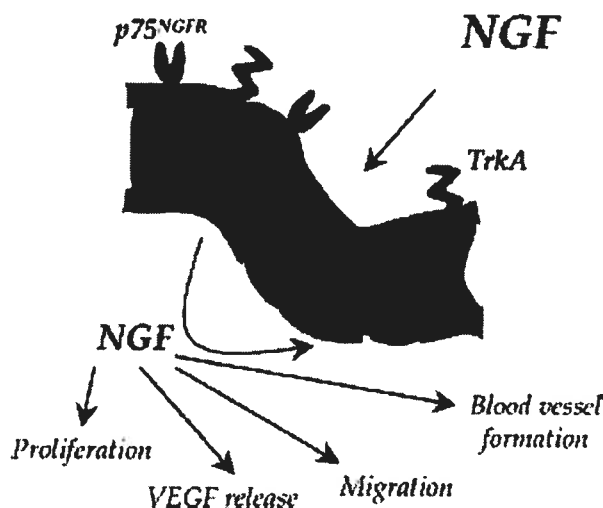
Figure 1.4 : Implication du NGF dans la réparation tissulaire : NGF et fibroblastes (extrait de Réf. #10)



Le NGF aurait une autre implication dans le processus de guérison tissulaire : sa participation dans le phénomène d'angiogénèse en tant que modulateur a été démontrée par plusieurs études. L'ischémie causée par une blessure conduirait à l'augmentation de l'expression du NGF ainsi que des récepteurs TrkA qui auraient une action directe sur les cellules endothéliales (voir fig. 1.5). Le NGF aurait donc un effet mitogénique direct sur l'endothélium, stimulant la prolifération et la migration de ces cellules endothéliales impliquées dans la formation de néo-vaisseaux.⁸⁶ Il serait également impliqué dans la relâche de VEGF, potentialisant une action stimulatrice

supplémentaire sur le phénomène d'angiogénèse. De plus, il aurait des actions indirectes sur la néovascularisation via un mécanisme dépendante de la voie VEGF-Akt-NO.⁸⁷

Figure 1.5 : Implication du NGF dans la réparation tissulaire : NGF et cellules endothéliales (extrait de Réf #10)



1.5.2 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Ce facteur neurotrophique est comparable en plusieurs points au NGF, tant au niveau de sa structure, sa synthèse, sa relâche, que de plusieurs de ses rôles. La figure 1.6 montre la structure du gène et de la protéine BDNF. Elle est, tout comme le NGF, synthétisée sous la forme de précurseur pré-pro, qui sera ensuite transformé, suivant une série de glycosylations dans les vésicules qui le transporte, en sa forme mature avant d'être sécrété (figure 1.7).⁸⁸ Il est également sécrété via des vésicules suite à une entrée calcique, mais en plus d'être libéré au niveau de la terminaison axonale, il est également relargué par les dendrites. Il joue, tout comme le NGF, un grand rôle dans

la régulation de la survie et la différenciation des neurones du SNC et SNP.⁸⁸ De plus, le BDNF joue un rôle particulièrement important dans la plasticité synaptique à long terme (LTP).⁸⁸ Tout comme le NGF, le BDNF peut être synthétisé et sécrété par des cellules non neuronales, telles que les astrocytes. Ses récepteurs font également partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, et sont appelés TrkB. Le BDNF peut également lier le récepteur à faible affinité p75.⁸⁸

Figure 1.6 : Structure du gène et de la protéine BDNF (extrait de Réf #88)

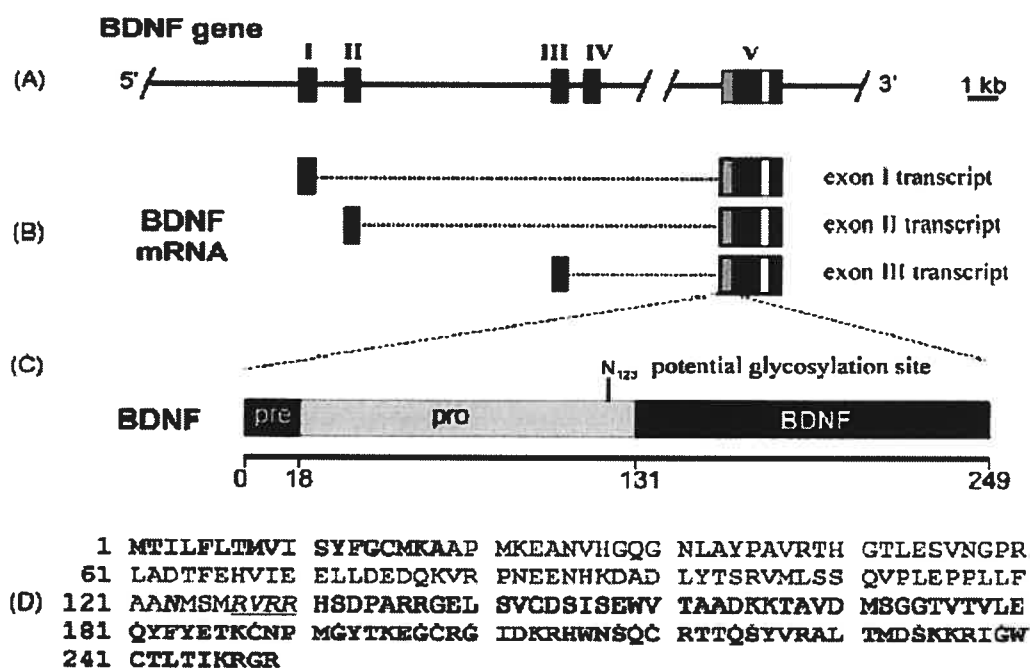


Fig.1.6. Structure de la protéine et du gène BDNF de rat. (A) Chacun des quatre exons 5' (I-IV) inclue leur propre promoteur, et est combiné avec l'exon 3' (V) pour former un ARNm codant pour un pré-pro-BDNF. La partie blanche de l'exon V représente un site de séparation alternative, donnant naissance à deux différents ARNm provenant de chacun des quatre ARNm. Chacun de ces ARNm est spécifique à un tissu et est régulé différemment durant le développement (voir Timmusk et al., 1994, 1995). La portion grise de l'exon V code pour la protéine pré-pro-BDNF. (C et D) Structure primaire et séquence de la protéine BDNF. La pré-séquence (18aa, noir) est coupée immédiatement après la séquestration de la protéine naissante dans le RE. Le BDNF mature (noir) est excisé du précurseur pro-BDNF par l'action de convertases spécifiques résidentes dans les RTG (réseau trans-Golgi) ou dans les granules sécrétoires immatures (voir texte). N₁₂₃ indique un site potentiel de glycosylation.

Figure 1.7 : Synthèse, stockage et sécrétion du BDNF (extrait de Réf #88)

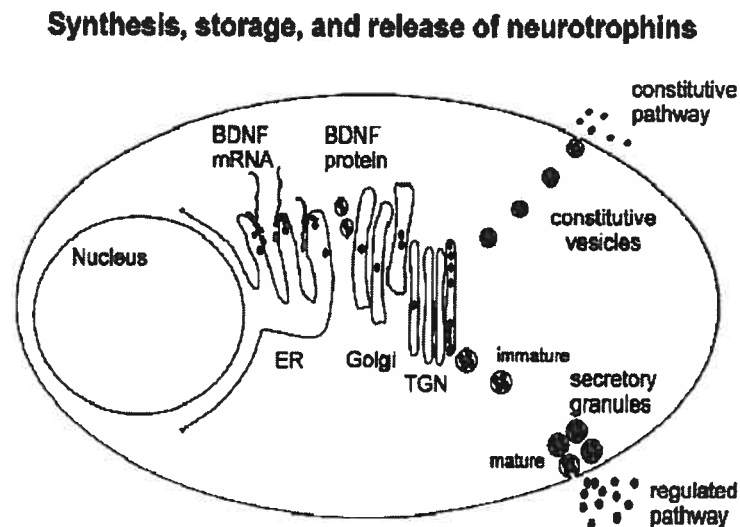


Figure 1.7. Route empruntée par le BDNF de la synthèse à la sécrétion. L'ARNm du BDNF est traduit des ribosomes (gris pâle) du RE rugueux et les précurseurs protéiniques (pré-pro) sont séquestrés dans le RE (symboles noirs). Le BDNF est ensuite dirigé dans le Golgi, puis dans le réseau trans-Golgi (TGN; trans-Golgi network) dans des vésicules. Les protéines convertases (PCs) résidentes dans le TGN couperont les pro-séquences, et le BDNF mature sera dirigé dans les vésicules constitutivement relarguées. De manière aléatoire, du pro-BDNF sortira du TGN dans des granules sécrétoires immatures (blanc) contenant une variété distincte de protéines convertases. Le BDNF mature contenu dans les granules sécrétoires sera dirigé vers la membrane plasmique et sera éventuellement relâché (voir texte).

1.6 Neurones et cellules gliales

Deux grands systèmes de contrôle règnent chez les vertébrés : le SNC et le SNP. Deux principales classes de cellules sont retrouvées dans ces systèmes : les neurones et les cellules gliales. Puisque ces grands systèmes sont omniprésents dans tout le corps, il est important de considérer leurs rôles dans la guérison tissulaire. Voici donc une brève description des types cellulaires formant ces systèmes, en plus de leurs implications dans la cicatrisation.

1.6.1 Neurones

Les neurones forment une famille de cellules hétérogènes tant au niveau de la morphologie que de la fonction. Une première classification peut d'abord être faite selon le nombre de leurs neurites : il y a donc les neurones unipolaires (un seule neurite), bipolaire (deux neurites) ou multipolaire (plus de trois neurites). La majorité des neurones sont multipolaires. On peut également classer ces cellules selon leurs dendrites, c'est-à-dire la forme donnée à la cellule selon son arbre dendritique : cellules pyramidales versus cellules en étoile. On peut également considérer ou non la présence d'épines sur les dendrites : épineux ou non-épineux. Enfin, sa classification peut se faire selon sa connectivité, la longueur de son axone, selon ses neurotransmetteurs, etc.

On retrouve plusieurs propriétés qui sont singulières aux neurones. Toutes ces cellules sont excitables, polaires (ses extrémités ont une organisation et une fonction particulière en ce qui a trait à la transmission de l'information), et ont un métabolisme particulier (la molécule énergétique exclusive du neurone est le glucose). De plus, ces cellules ont été considérées longtemps comme n'ayant plus la capacité de se diviser, dû à l'incapacité de retourner dans la phase G1 du cycle mitotique cellulaire. On remet de plus en plus en doute cette dernière affirmation de nos jours.

1.6.1.1 Marqueurs propres aux neurones

Les neurones possèdent des caractéristiques propres qui les distinguent des autres cellules des SNC et SNP. Voyons quelques marqueurs spécifiques des cellules neuronales.

Neurofilaments

Les neurofilaments font partis de la classe des filaments intermédiaires de type IV constituant le cytosquelette des cellules eukaryotiques. Ce sont des structures allongées de 8 à 10 nm de diamètre abondantes dans le cytoplasme et dans l'axone, mais absentes des épines dendritiques. Ce sont des polymères composés de trois sous-unités protéiques (éventuellement phosphorylées). Ces filaments forment les faisceaux rigides qui assurent l'armature de l'axone. On connaît trois types de neurofilaments : Neurofilament-L (68 kDa), Neurofilament-M (145-160 kDa) et Neurofilaments-H (200 kDa).¹⁴⁷ Ces filaments intermédiaires sont retrouvés dans les neurones matures en plus de les retrouvés dans les cellules de phéochromocytomes (PC12).^{147, 178}

Peripherin

Cette protéine de ~57 kDa forme un des membres des filaments intermédiaires de type III avec la vimentin, la desmin et la protéine fibrillaire acide gliale (GFAP). Ces protéines peuvent former des homo- et des hétéropolymères. En ce qui concerne la peripherin, ces filaments s'étendent de la périphérie de la cellule vers le noyau et forme des points d'encrages entre la matrice nucléaire, les microfilaments d'actine et la MEC.⁸⁹⁻⁹⁰ La peripherin a tout d'abord été identifiée chez les neuroblastomes, puis chez les cellules de phéochromocytome (PC12), pour enfin avoir été identifiée au niveau d'une variété de neurone du SNP.^{91-92, 177} Des études plus récentes ont

également démontré sa présence dans le SNC durant le développement et au niveau adulte.^{93-94, 177} En effet, on retrouverait cette protéine dans de petits neurones des ganglions sympathiques et sensoriels, mais également dans la racine ventrale cervicale, dans le ganglion du nerf crânien, et dans le système nerveux entérique. Certains neurones corticaux, hippocampaux et cérébelleux peuvent exprimer la peripherin.

GAP-43

Cette protéine associée à la croissance (de poids moléculaire de 43-57 kDa) est une phosphoprotéine intracellulaire associée à la membrane plasmique et retrouvée exclusivement dans le SNP et SNC.¹⁴⁹ Il s'agit de la protéine majeure impliquée dans la croissance des cônes axonaux et dans certaines terminaisons synaptiques. Cette protéine est par contre absente des cônes de croissance dendritiques.¹⁵⁰

1.6.2 Cellules gliales

Une définition générale retrouvée dans la littérature qualifie les cellules gliales de cellules accessoires aux neurones, jouant des rôles secondaires dans le cerveau. Ces cellules sont en fait très peu connues et, de nos jours, la recherche tend à leur conférer une implication beaucoup plus importante dans le traitement de l'information dans le cerveau. Ce groupe comprend quatre types de cellules : les astrocytes, les oligodendrocytes, les microglies et les cellules de Schwann. On retrouve également une autre population cellulaire dans le cerveau, qualifiée de non-neuronale : les

cellules épendymaires. Les cellules de Schwann sont retrouvées uniquement dans le SNP, et sont l'équivalent des oligodendrocytes du SNC. Par contre, on retrouve les autres cellules gliales en association avec les nerfs périphériques en plus de les retrouver dans le SNC. Elles sont nommées cellules satellites dans le SNP. Voyons plus en détail chacun de ces groupes de cellules.

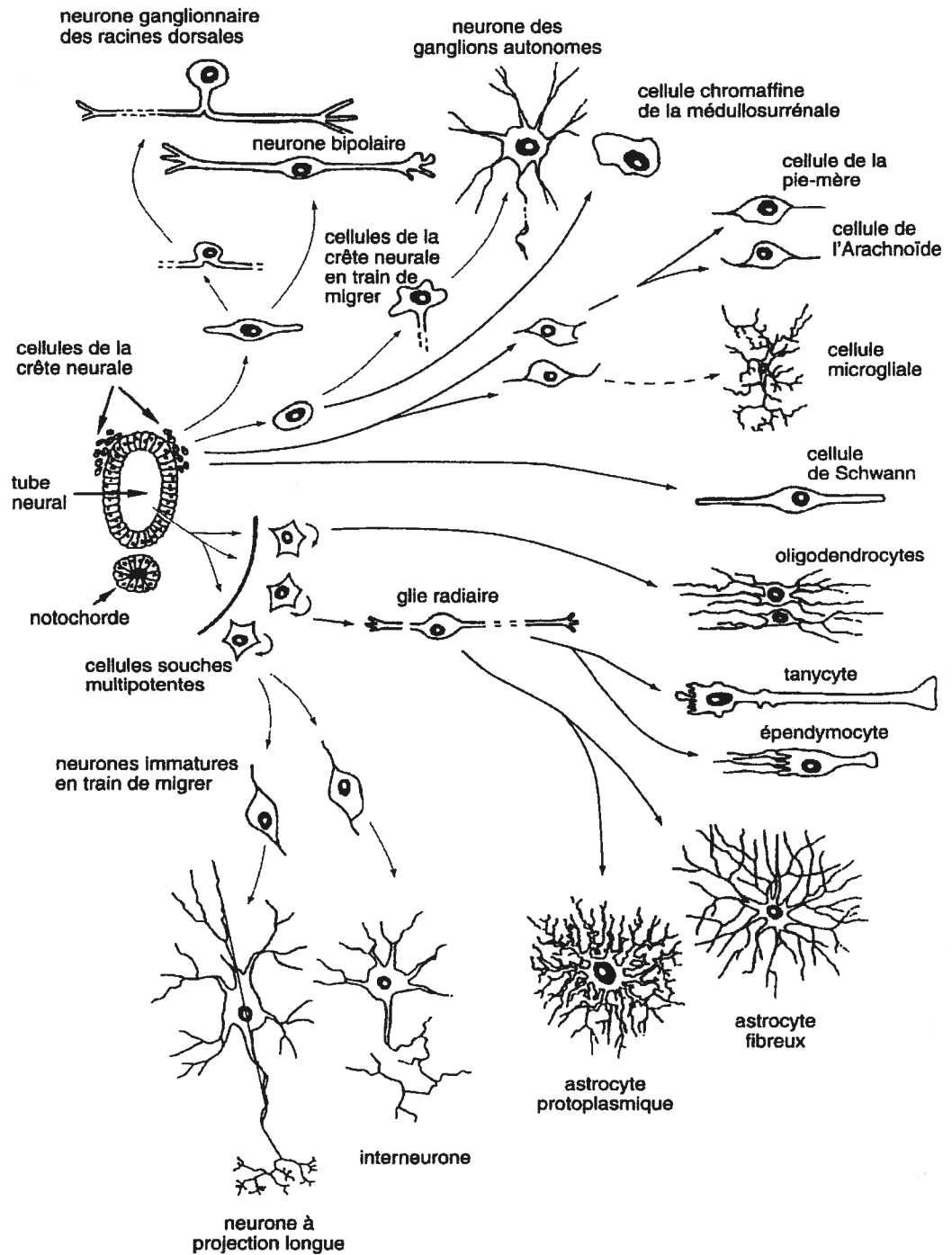
1.6.2.1 Les astrocytes

Ce sont les cellules gliales les plus nombreuses retrouvées dans le cerveau (40% de la population cellulaire totale). Ces cellules auraient pour rôle de réguler la composition du milieu extracellulaire des neurones. En effet, ces cellules combleraient la majorité de l'espace retrouvé entre les neurones, servant tout d'abord de charpente à ces derniers durant le développement, mais formeraient également une sorte d'enveloppe autour des jonctions synaptiques, leur permettant de limiter l'espace de diffusion des neurotransmetteurs libérés et ainsi de réguler leur concentration.⁹⁵⁻⁹⁷ Ces cellules seraient également impliquées dans l'établissement de la barrière hématoencéphalique via ses influences sur les petits vaisseaux sanguins. Elles joueraient également un rôle dans la guérison et la cicatrisation des tissus cérébraux lors de blessures (sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoire; présentation antigénique intracérébrale), ainsi que dans la recapture du surplus potassique lors de suractivité cérébrale, afin de maintenir les concentrations ioniques extracellulaires du cerveau.⁹⁵⁻⁹⁷ En plus de ces fonctions, les astrocytes exerceraient des effets neuroprotecteurs grâce à leur synthèse de facteurs neurotrophiques : NGF, BDNF et GDNF. D'autre part, elles

synthétiseraient aussi des facteurs de survie pour les oligodendrocytes, comme le PDGF, le LIF, le CNTF, le b-FGF, l'IGF et la NT-3.

Les cellules du lignage astroglial sont, avec les neurones, les premières cellules à se différencier à partir de cellules souches pluripotentes issues de l'épithélium germinatif du tube neural (réf figure 1.8). Dans les premières étapes de la neurogénèse, les cellules de la glie radiaire (ou astrocytes bipolaires) se différencient en astrocytes. Cette différenciation semblerait être réversible,⁹⁸ illustrant la très grande plasticité du lignage astrocytaire. Un autre exemple illustrant cette plasticité peut être observé dans les progéniteurs bipotentiels appelés O-2A (pour oligodendrocyte/astrocyte de type 2). Ce précurseur donnerait naissance à ces deux types de cellules in vitro, tout dépendant du milieu de culture utilisé (avec ou sans sérum). Ceci n'a jamais été démontré in vivo, mais illustre une fois de plus la très grande malléabilité de ce type cellulaire, dont le phénotype pourrait être modifié par des changements de l'environnement, en conditions pathologiques par exemple.

Figure 1.8 : Origine, migration et différenciation des différents types de neurones et de cellules gliales dans le système nerveux des vertébrés (extrait de Réf. #96)



Origine, migration et différenciation des différents types de neurones et de cellules gliales dans le système nerveux des vertébrés. Les neurones du système nerveux périphérique sont représentés dans la partie haute de la figure, les cellules gliales au centre, et les neurones du système nerveux central dans la partie inférieure. Noter que les cellules progénitrices, dans la zone ventriculaire, donnent naissance directement à des neurones et à des cellules gliales, avant que ces cellules migrent vers leur destination finale, où elles prennent leur morphologie définitive.

En ce qui a trait à leur morphologie, les astrocytes varient énormément en fonction du stade de développement, des influences de la région du SNC dans laquelle ils sont situés, ainsi que des situations physiopathologiques particulières où ils se trouvent. En effet, suite à une blessure du SNC, on voit une transformation d'astrocytes résidents (quiescents astrocytes) en une forme réactive, métaboliquement active : astrocytes réactifs (reactive astrocytes). Ces derniers se distinguent par une hypertrophie cellulaire, une augmentation dans les taux d'expression de la protéine GFAP, de vimentin, de S-100 β , ainsi que certains constituants de la MEC et d'une variété de cytokines et facteurs de croissances.⁹⁹⁻¹⁰⁰

Conséquemment à ces variations, il nous est donc possible d'identifier chaque type cellulaire de la lignée gliale grâce à l'expression de protéines spécifiques. Voyons plus en détail quelques unes de ces protéines.

1.6.2.1.1 Marqueurs spécifiques aux astrocytes

Vimentin

La vimentin est un des membres de la famille des filaments intermédiaires de type III avec un poids moléculaire de 58 kDa. Il s'agit d'un filament qui s'ancre à la membrane nucléaire et se prolonge jusqu'à la membrane plasmique. Cette protéine n'est pas retrouvée que dans les astrocytes (immatures et matures (réactifs) lorsque co-localisés avec GFAP). On peut retrouver ce type de filament intermédiaire dans tous les types de cellules d'origine mésenchymale, tels que les fibroblastes, les cellules

endothéliales, les lipocytes, les macrophages, les chondrocytes, les tissus lymphoïdes, les mélanocytes, ainsi que les cellules cancéreuses dérivant de ces cellules, incluant les sarcomes, les lymphomes, les mélanomes ainsi que les lésions métastatiques.¹⁵¹⁻¹⁵⁷

Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

Cette protéine de 50 kDa forme également un filament intermédiaire de type III qui est, pour sa part, localisé dans les astrocytes en développement, normaux, réactifs et néoplastiques dans le SNC, en plus de le retrouver dans plusieurs tumeurs dérivant de cellules gliales. Il est également exprimé dans les oligodendrocytes en développement (cellules de Schwann) dans le SNP. Cette protéine n'est, par contre, pas exprimée dans les neurones.^{153, 155, 158-162}

S-100

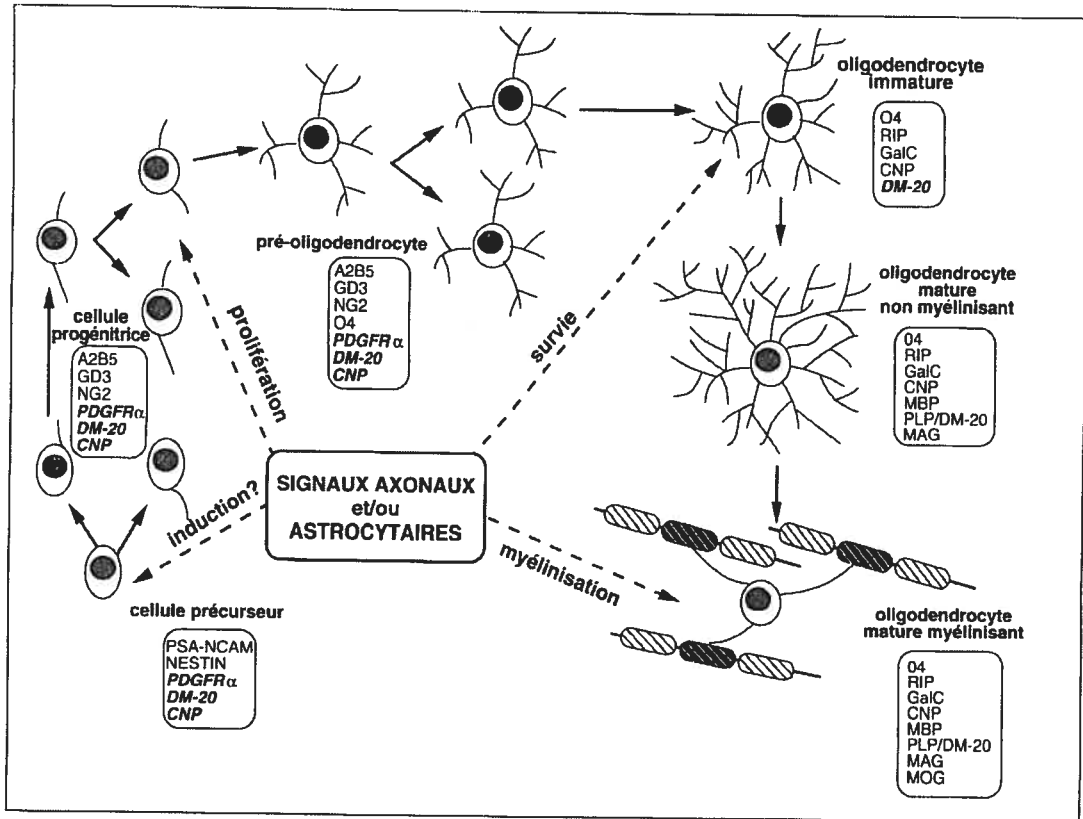
La famille des S-100 comprends au moins 10 membres avec un patron d'expression spécifique à chacun des types cellulaires.¹⁶³ À cause de son homologie dans sa séquence primaire, cette protéine peut être regroupée avec les protéines qui lient le calcium (calcium binding proteins),¹⁶⁴ comme la calmoduline, la paryalbumine, la chaîne légère de la myosine, ainsi que la troponine-C. La S-100 (10-20 kDa) est considérée comme étant une protéine régulatrice de la croissance cellulaire, mais plusieurs autres fonctions ont été suggérées : augmenter la perméabilité membranaire aux cations, stimuler l'activité de l'ARN polymérase nucléolaire, interagir avec la protéine suppresseur de tumeur p53, en plus de jouer un rôle de transporteur de protéines et d'acide gras libre dans les adipocytes.

La protéine S-100 est abondamment distribuée dans les tissus neuronaux et non-neuronaux, de même que dans les tissus tumoraux (tumeurs mélanocytiques de la peau). Au niveau du cerveau, cette protéine est retrouvée dans les cellules gliales et épendymaires, en plus de la retrouver dans les cellules de Schwann au niveau du SNP. Les cellules de Langerhans et les mélanocytes au niveau de la peau expriment également le S-100.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶

1.6.2.2 Les Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules qui se différencient le plus tardivement au cours du développement. Ce sont des cellules post-mitotiques matures, dont la fonction principale est de synthétiser des gaines de myéline autour de l'axone de nombreux neurones du SNC. Les précurseurs de ces cellules proviennent également de cellules souches multipotentes originaires du tube neural. Les cellules du lignage oligodendrocytaire devront passer par plusieurs stades de développement associés à une évolution de la morphologie et de l'expression de marqueurs spécifiques permettant de les distinguer. Ce développement se faisant dans un environnement entouré de neurones et d'astrocytes, il est donc naturel que les signaux venant de ces deux types cellulaires influencent le développement des oligodendrocytes.⁹⁵⁻⁹⁷ La figure 1.9 montre l'évolution du lignage oligodendrocytaire comprenant les divers signaux neuronaux et astrocytaires.

Figure 1.9 : Représentation schématique de la lignée oligodendrocytaire, montrant les sites d'action des signaux neuronaux ou astrocytaires (extrait de Réf #96)



Représentation schématique du lignage oligodendrocytaire, montrant les sites d'action des signaux neuronaux ou astrocytaires. Au cours de la différenciation du lignage oligodendrocytaire, la cellule précurseur devient successivement progénitrice, préoligodendrocyte, puis cellule postmitotique ou encore oligodendrocyte immature. Suit la période de maturation avec apparition de l'oligodendrocyte mature non myélinisant et enfin myélinisant. Chacune de ces étapes se caractérise par une augmentation de la complexité de la morphologie, une perte ou une acquisition de marqueurs spécifiques, ARNm (indiqués en italique dans les cartouches) ou antigéniques (les plus consensuels sont indiqués ainsi que les anticorps identifiant certains d'entre eux), une perte des capacités de migration, un ralentissement puis l'arrêt de la prolifération et enfin l'aboutissement au phénotype mature, l'oligodendrocyte myélinisant. (GD3 et A2B5 sont des gangliosides; GalC: galactocérebroside; O4 est un sulfatide; PDGFR α : récepteur α du Platelet-Derived Growth Factor; CNP: 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase; PLP et DM20: protéolipides majeurs de la myéline; MBP: Myelin Basic Proteins; MAG: Myelin Associated Glycoprotein; MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein.)

En ce qui a trait aux rôles des oligodendrocytes, en plus de la myélinisation des axones du SNC, ils joueraient un rôle vraisemblablement important dans la régulation du pH extracellulaire, de même que dans la formation d'un réseau anatomique de voies axonales de la substance blanche du cerveau.

Dans le cas d'une lésion de la moelle osseuse, les oligodendrocytes peuvent également jouer un rôle dans la remyélinisation. Pour ce faire, il doit y avoir préalablement présence de nouveaux oligodendrocytes. Longtemps on croyait que les oligodendrocytes se différencient de manière définitive en une forme mature. Pourtant, il existe des données suggérant que ces cellules différenciées pourraient ré-entrer dans le cycle cellulaire dans le but de proliférer, mais il semblerait que ce soit un événement plutôt rare.¹⁰¹⁻¹⁰² On conférerait plutôt ce rôle à de nouveaux oligodendrocytes différenciés provenant de cellules précurseurs (oligodendrocytes progenitor cells, OPC).¹⁰³

1.6.2.2.1 Marqueurs spécifiques aux oligodendrocytes

Myelin-oligodendrocyte specific protein (MOSP)

Cette protéine est retrouvée principalement dans les oligodendrocytes qui sont en train de former les feuillettes membranaires impliqués dans la formation de la gaine de myéline. Dans la littérature, il est établi que cette protéine ne se retrouve pas dans les astrocytes de type 1 et 2, ainsi que dans les cellules de Schwann.¹⁷¹ Elle n'est également pas exprimée par les fibroblastes. Par contre, en conditions pathologiques, il semblerait que les cellules de Schwann acquièrent plusieurs caractéristiques des oligodendrocytes, dont l'expression de MOSP.¹⁷²

Myelin basic protein (MBP)

On connaît quatre isoformes majeurs de la MBP : 14, 17, 18.5 et 21 kDa. Les isoformes de 21.5 et 17 kDa sont principalement exprimés dans les début de la myélinisation, ainsi que dans les oligodendrocytes immatures, tandis que les isoformes de 18.5 et 14 kDa sont exprimés plus tardivement dans le processus de myélinisation, dans les oligodendrocytes matures.¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ Cette protéine jouerait un rôle surtout au niveau de l'épaisseur de la gaine de myéline en facilitant l'adhésion des surfaces intracellulaires des feuillettes de myéline.¹⁶⁹

1.6.2.3 Les microglies

Les cellules microgliales originent du mésoderme et constituent une population de cellules immunocompétentes au niveau du cerveau. Ces cellules restent dans un état inactif en condition physiologique, mais suite à une perturbation du système nerveux central, elles se transforment très rapidement en macrophages (changement morphologique accompagné de l'expression de marqueurs spécifiques), se divisent, migrent dans la région affectée et produisent une très grande variété de substances bioactives incluant les cytokines et les facteurs de croissances. C'est dans cet état actif que les microglies ressemblent le plus aux macrophages de la périphérie.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ Cette classe de cellules compte pour environ 20% de la population totale de cellules gliales.⁹⁶ En ce qui concerne l'identification de ces cellules, elles sont facilement retraçable au niveau du SNC via leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II, ainsi que par la présence de plusieurs récepteurs membranaires (CD11b, CD14, F4/80, CD45, CD68, S22, etc.).¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Par contre, il

devient plus difficile de discerner les microglies des monocytes/macrophages au niveau de la périphérie, puisque la majorité de ces protéines leur sont commune. On doit donc s'en remettre à l'aspect morphologique des cellules, qui est, dans le cas des microglies, très distinctif grâce à sa forme amiboïde ou ramifiée.⁹⁶

1.6.2.4 Cellules de Schwann

Ces cellules sont l'équivalent des oligodendrocytes, mais au niveau du SNP. Elles sont associées avec les axones des nerfs périphériques, et peuvent être myélinisantes ou non-myélinisantes. Dans le cas des cellules myélinisantes, elles entourent un unique axone de large diamètre, tandis que les cellules non-myélinisantes peuvent engainer de nombreux axones de petits diamètres dans leur cytoplasme. La majorité des cellules de Schwann origine de cellules de la crête neurale qui ont émergé de la région dorsale du tube neural au moment de sa fermeture. Par contre, certaines proviennent de cellules neuroépithéliales du tube neural. Plusieurs marqueurs spécifiques distinguent les différents stades de développement des cellules de Schwann. Ces étapes et ces marqueurs sont illustrés à la figure 1.10.

Figure 1.10 : Schéma des étapes de développement des cellules de Schwann (extrait de Réf #96)

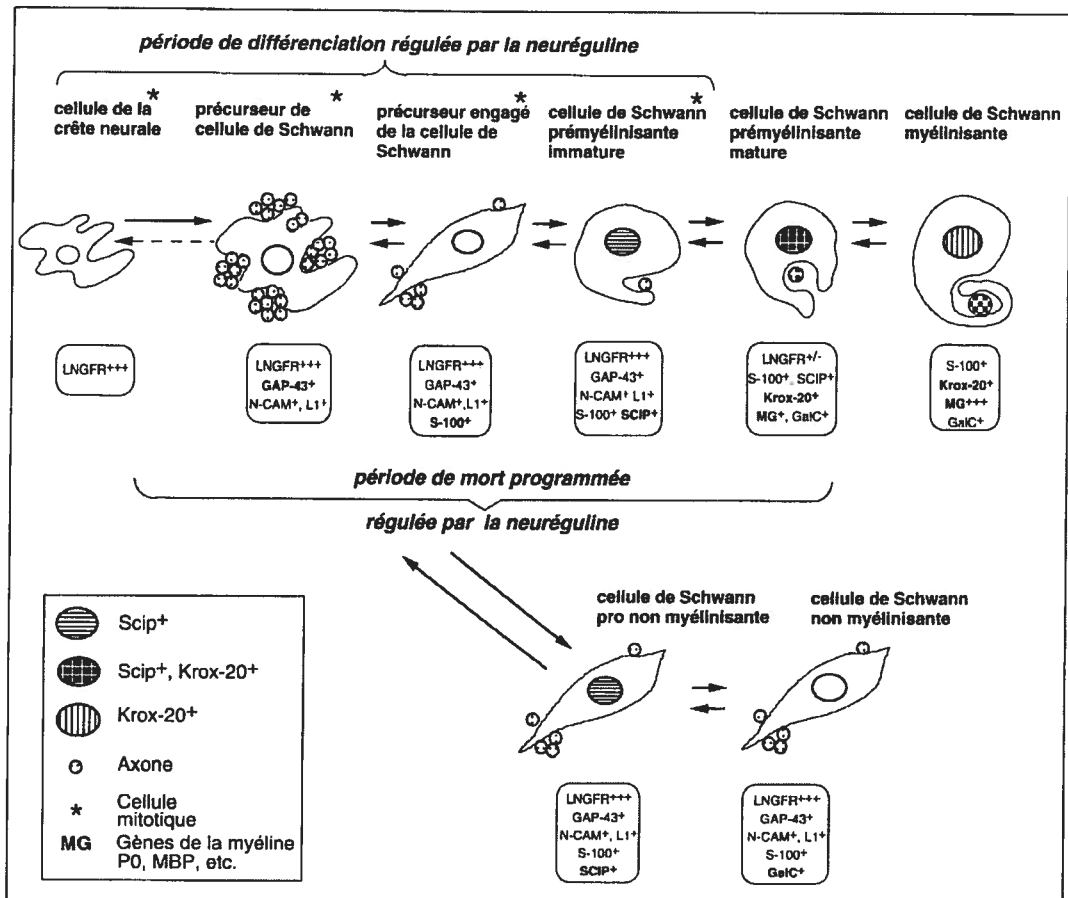


Schéma des étapes du développement des cellules de Schwann. Ce modèle est fondé sur des observations réalisées sur des cultures de cellules, ainsi que sur des souris transgéniques surexprimant ou ayant subi l'inactivation d'un gène. Les cellules de Schwann myélinisantes expriment le facteur de transcription SCIP jusqu'à la mise en place du premier « tour » de myéline. Bien que les étapes de la différenciation soient réversibles, par exemple par rupture du contact avec l'axone, la cellule de Schwann chez les mammifères ne pourrait pas régresser jusqu'au phénotype de la cellule de la crête neurale multipotente (cette incertitude est indiquée par une flèche en pointillés). Les ronds rouges représentent les axones et les cartouches indiquent les marqueurs spécifiques des différents stades de différenciation. En gras sont soulignés les marqueurs qui identifient un stade de maturation.

(Gap43 : *Growth-associated-protein-43*; N-CAM : *Neural Cell Adhesion Molecule*; L1 : molécule de la famille des immunoglobulines; S-100 : protéine de la cellule de Schwann (et de l'astrocyte) liant le calcium; Krox-20 : facteur de transcription à doigt de zinc; GalC : galactocérebroside; P0 et MBP : protéines de structure de la myéline; LNGFR : récepteur à basse affinité du NGF; +/- : faible taux d'expression; +++ : taux d'expression élevé; + et ++, taux intermédiaires.) (D'après [2.72], avec la permission de *Current Biology*.)

Le rôle de ces cellules est très similaire à celui des oligodendrocytes, c'est-à-dire qu'elles jouent un rôle d'isolant des axones des neurones en ce qui a trait à la conduction des courants électriques, et jouent un rôle dans la synthèse de facteurs de croissance qui donnent un support trophique aux axones qu'elles entourent. Par

contre, ces cellules jouent également un rôle à la jonction neuromusculaire en participant à sa formation ainsi qu'à son bon fonctionnement. Les cellules de Schwann peuvent également participer à la régénération des axones lésés. En effet, lors d'une blessure nerveuse, l'axone serait responsable de la libération de facteurs qui différencieraient les cellules de Schwann adjacente, les induisant à exprimer un certain nombre de protéines qui étaient présentes dans des stades antérieurs de développement afin de favoriser la repousse axonale. Parmi ces protéines, on retrouve des facteurs neurotrophiques, des molécules de surface comme le récepteur p75 au NGF, ainsi que des molécules d'adhésion (dont l'importance pour la croissance des neurites en présence des cellules de Schwann a été démontrée *in vitro*¹⁰⁹).

1.6.2.5 Cellules épendymaires

Cette population cellulaire tapisse la lumière des ventricules cérébraux ainsi que le canal central de la colonne vertébrale. Elles proviennent des cellules neuroépithéliales qui donnent naissance aux neurones et aux cellules gliales lors du développement cérébral. Les cellules épendymaires possèdent une multitude de cils à leur surface apicale participant à la circulation des fluides céphalorachidiens entre les différents ventricules.¹¹⁰ Il s'agit donc d'une population cellulaire non-neuronale du cerveau, qui est reconnue pour sa pluripotentialité (capacité de générer des cellules gliales et des neurones) en réponse à une blessure cervicale.¹¹⁰ Ces cellules se différencieront en astrocytes réactifs qui joueront un rôle important dans la cicatrisation.¹¹⁰

1.6.3 Rôles du NGF dans l'innervation de la cicatrice cutanée

Il a été démontré à plusieurs reprises dans la littérature que des fibres sensoriels (neurones exprimant du CGRP) et sympathiques (en densité plus faible) formeraient un « plexus cicatriciel » au site de lésion lors d'une blessure tissulaire.¹¹¹⁻¹¹² L'implication de ces fibres est incontestable dans la guérison tissulaire : concept démontré lors d'une étude comparant la guérison tissulaire chez des humains normaux versus paraplégiques et quadraplégiques démontrant que ces derniers ont une mauvaise cicatrisation due à la perte de l'innervation¹¹³; concept également démontré lors d'une étude faite chez des animaux dénervés chirurgicalement ou chimiquement¹¹⁴⁻¹¹⁵ appuyant cette même hypothèse. On ne connaît toujours pas précisément la cible de ces fibres.

Il a été démontré que les niveaux protéiques de NGF étaient fortement augmentés au site de la blessure. Cette production accrue serait surtout due aux myofibroblastes, mais également aux macrophages, aux kératinocytes, aux cellules musculaires lisses, ainsi qu'aux adipocytes.⁹ Cette neurotrophine jouerait un rôle très important dans la croissance des fibres nerveuses sensorielles au niveau du tissu blessé.^{9,12} Cette innervation serait également amplifiée par d'autres facteurs relâchés par les myofibroblastes : facteurs de la MEC, telle que la laminine, qui est connue pour promouvoir la neuritogénèse.¹¹⁶⁻¹¹⁷

D'autre part, il a également été démontré que le processus de neuritogénèse était beaucoup plus efficace chez les rats néonataux que chez les rats adultes,

principalement à cause des différences retrouvées dans la synthèse de NGF (qui est beaucoup plus élevée chez les néonataux) ainsi qu'à l'hyperinnervation sensorielle marquée chez les néonataux.¹² En effet, suite à l'ajout d'anti-NGF dans le site cicatricielle, la croissance des neurites a été complètement bloquée chez les rats adultes, tandis que chez les néonataux, aucun effet n'a été observé. Ceci laisse présager qu'il existerait des moyens palliatifs à la présence du NGF pour la croissance des fibres neuronales sensibles chez les rats néonataux, possiblement via d'autres facteurs neurotrophiques.¹¹⁸

1.6.4 Rôle de l'innervation de la cicatrice dans la guérison tissulaire

On ne connaît pas les cellules cibles par lesquelles les fibres nerveuses pourraient influencer la guérison cicatricielle. La possibilité que les cellules inflammatoires et le tissu vasculaire soient une des cibles a par contre déjà été explorée.¹¹⁹⁻¹²⁰ D'autre part, une étude récente tendrait plutôt vers l'hypothèse que les myofibroblastes pourraient constituer une meilleure cible au plexus cicatricielle. En effet, c'est via le potentiel contractile de ces cellules que les nerfs favoriseraient cette cicatrisation, en accélérant sa contraction et réduisant conséquemment sa dimension.¹² Cette hypothèse a été confirmée grâce à la relation temporelle et spatiale démontrée dans l'apparition des myofibroblastes et des cellules nerveuses au niveau de la cicatrice cutanée.¹² Le rôle de plusieurs neuropeptides sensoriels (Substance P, CGRP, neurokinine A) sur les myofibroblastes reste par contre à démontrer in vivo, puisque des effets mitogéniques ont déjà été observés in vitro sur les fibroblastes et les cellules musculaires lisses.¹²

1.7 Cellules Souches Neuronales

Au niveau du système nerveux central, toutes les cellules présentes (neurones, astrocytes, oligodendrocytes et cellules épendymaires) dérivent du neuroépithélium tapissant la cavité interne du tube neural de l'embryon en développement. L'ordre chronologique des événements semble d'abord être initié par la neurogénèse, suivi de la gliogénèse. Un peu après la naissance, lorsque la formation des neuroblastes et des glioblastes a cessé, les cellules neuroépithéliales restantes se transforment en cellules épendymaires retrouvées dans le système ventriculaire et subventriculaire adulte.⁹² Ces cellules formeront le réservoir de cellules souches nerveuses (CSN) chez l'adulte, en association avec au moins une population de cellules progénitrices en développement ainsi que deux différentes populations de cellules souches multipotentes. En fait, il a été démontré qu'il y aurait des régions spécifiques du cerveau où l'on verrait une neurogénèse modérée et continue se poursuivant tout au long de la vie.¹²¹⁻¹²²

1.7.1 La nature des cellules souches neuronales

Les CSN sont considérées comme des progéniteurs primaires (ou cellules souches), c'est-à-dire qu'elles jouent le rôle de précurseurs de progéniteurs secondaires multipotents. Ces progéniteurs secondaires donneront à leur tour naissance à un précurseur confiné à former une lignée spécifique du SNC.

1.7.2 Source des cellules souches neuronales

La principale source *in vivo* de CSN se situe dans le sous-épendyme (SE), qui consiste en 2-3 couches cellulaires immédiatement adjacentes aux couches épendymaires des ventricules latéraux du cerveau.¹⁷⁹ Les SCN vont former des précurseurs qui vont ensuite proliférer et voyager le long du flot migratoire rostral jusqu'au bulbe olfactif où elles se différencieront en interneurons fonctionnels. La couche sous-granulaire du gyrus dentatus (GD) de l'hippocampe contient également une population de cellules capables de proliférer, de migrer et de se différencier en neurones granulaires fonctionnels dans l'hippocampe. Par contre, ces cellules (progénitrices secondaires) ne sont pas considérées comme des cellules souches car elles n'ont qu'une capacité limitée de prolifération.¹⁷⁹

1.7.3 Identification des cellules souches neuronales

Lorsque prélevée et mise en culture, chaque CSN isolée proliférera en présence de facteurs de croissance et formera des colonies de clones flottants appelées neurosphères. Ces neurosphères sembleraient être constituées par une population mixte de cellules neuronales progénitrices et souches.¹⁸⁰ Il a été démontré que l'une des caractéristiques phénotypiques que les deux populations de cellules neurogéniques (localisé dans le SE et le GD) avaient en commun était l'expression de la protéine GFAP.¹⁸¹ Cette protéine à elle seule n'est pas un bon indicateur de « cellules souches » car plusieurs autres classes de cellules souches ne l'expriment pas (par exemple les cellules souches de la rétine¹⁸²), et d'autre part, les astrocytes qui représentent une forme cellulaire totalement différenciée, l'expriment. La protéine

nestin, une protéine formant un des filaments intermédiaires qui est exprimée par les neurones et les cellules gliales en développement, et sera remplacé par d'autres filaments intermédiaires spécifiques à chaque lignée au cours de la maturation.¹⁸⁴ Elle est également exprimée par la majorité des cellules des neurosphères *in vitro*, et également par les cellules du SE *in vivo*.¹⁸³ Quoi qu'il en soit, le domaine de la caractérisation des cellules souches demeure tout de même élué et beaucoup de travail reste encore à faire avant de trouver des marqueurs typiques à chaque groupe de progéniteurs.

1.7.4 Différents types de cellules souches et leurs marqueurs membranaires

Plusieurs marqueurs membranaires spécifiques à chaque type de cellules souches existent, mais il arrive parfois que des marqueurs spécifiques à un type cellulaire se retrouvent sur un autre. Ceci est peut-être dû au phénomène de plasticité cellulaire décrit plus bas. Le tableau 1.4 comprenant les principaux marqueurs membranaires spécifiques des trois types de cellules souches est présenté ci-dessous. D'autre part, il existe des marqueurs communs à tous les types de cellules souches, tels que des antigènes (Sca-1 et c-kit) ou des facteurs transcriptionnels (comme par exemple la télomérase reverse transcriptase).

Tableau 1.4 : Marqueurs membranaires spécifiques de différents types de cellules souches

Cellules souches	Progéniteurs	Marqueurs spécifiques
Cellule souche nerveuse (CSN)	Neurones, astrocytes, cellules de Schwann, oligodendrocytes, microglies	CD90
Cellule souche hématopoïétique (CSH)	Cellules sanguines (leucocytes, érythrocytes, plaquettes), ostéoclastes ¹⁰⁷	CD14, CD34, CD45, CD133
Cellule souche mésenchymale (CSM)	Cellules du tissu conjonctif (fibroblasts, chondrocytes, ostéocytes, adipocytes, cellules musculaires lisses) ^{107, 129-130}	CD9, CD29, CD31, CD38, CD44, CD54, CD71, CD90, CD105, CD106, CD166

1.7.5 Plasticité des cellules souches

L'existence de CSN dans les ventricules cérébraux chez l'adulte a été une découverte plutôt surprenante, puisque l'on croyait toute régénération nerveuse impossible à ce niveau. De plus, comprendre les conditions environnementales nécessaires à la différenciation d'un type cellulaire spécifique à partir d'une cellule souche relève d'une intégration de tous les facteurs présents dans le milieu, et non pas seulement de son origine intrinsèque. L'ancienne croyance suggérait que des cellules souches retrouvées chez l'adulte ne pouvaient générer que les types de cellules présents dans son tissu de résidence. Il a par contre été démontré tout récemment que ce n'était pas le cas. Des études *in vivo* ont démontré que des CSN adultes, une fois injectées dans la circulation sanguine, acquerraient les caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques.¹¹⁰ En fait, en plus de cette étude, il est maintenant établi que les CSN ont le potentiel de générer des progénitures des trois couches germinales (ectoderme, mésoderme et endoderme).

Ce concept a été défini par plusieurs chercheurs comme étant une forme de plasticité cellulaire. Ils ont émis plusieurs concepts hypothétiques concernant la manière par laquelle une cellule pourrait changer de lignage. Tout d'abord, il y aurait la transdifférenciation, où une cellule complètement différenciée se change en un tout autre phénotype, souvent sans division. D'autre part, le changement de lignage peut se faire par transdétermination. Dans ce cas, c'est un type de cellules souches prédéterminées à générer un type particulier de cellules qui changent ses propriétés pour ceux d'une autre sorte de cellules souches. En troisième lieu, il y a la dédifférenciation d'une cellule différenciée en une cellule souche commune, suivie d'une redifférenciation en un autre type cellulaire précis.^{110, 123, 124} Il est donc possible d'observer le phénomène de plasticité, mais on ne sait toujours pas par lequel des ces mécanismes elle se produirait.

Dans la plupart des cas de plasticité cellulaire observés, ce phénomène se produirait suite à des dommages tissulaires, ou en conditions pathologiques. Il semble donc qu'une modification de l'environnement cellulaire soit un prérequis pour observer le phénomène de plasticité, sans quoi les cellules continueraient de progresser selon le pedigree stéréotypé auquel elles étaient prédestinées.¹²⁴ Il est donc important d'accroître les recherches dans ce domaine afin de mieux comprendre comment il nous serait possible de manipuler l'identité cellulaire dans les conditions pathologiques.

1.7.6 Implication des cellules souches dans la réparation tissulaire

Il a été démontré que suite à une blessure au niveau du SNC chez l'adulte (moelle épinière, cerveau), il y aurait recrutement de cellules souches et différenciation en cellules neuronales et gliales pour la formation de tissus cicatriciels et la réparation de la zone lésée. L'implication des cellules épendymaires dans la formation d'astrocytes réactifs recrutés pour la formation de la cicatrice gliale a été démontrée à plusieurs reprises.¹²⁵⁻¹²⁸ Les cellules épendymaires se différencient au niveau des ventricules cérébraux en astrocytes réactifs, et migrent, par la suite, vers le site de la blessure afin de participer à la cicatrisation. Par contre, ces cellules ne se différencieraient pas en neurones dans ces conditions. Il existe tout de même d'autres progéniteurs au niveau du SNC qui pourraient avoir ce rôle. En effet, des études *in vivo* ont démontré que des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (qui ont initialement le potentiel de se différencier en ostéocytes, chondrocytes, adipocytes et en cellules musculaires¹²⁹⁻¹³⁰) pourraient se différencier en cellules gliales, mais également en neurones.¹³¹⁻¹³² Par contre, des conditions spécifiques sont requises pour ce faire. En effet, l'équipe de Kim et al.¹³³ a démontré qu'il était possible de stimuler la différenciation des CSM en cellules neuronales (caractérisée par l'expression de neurofilaments, TuJ-1 et vimentin) dans un milieu stimulé avec le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) et l'acide rétinoïque (RA) sur une matrice de fibronectine.¹³³

De plus, d'autres études ont démontré l'implication des cellules souches dans la guérison tissulaire d'une blessure cutanée. Après injection de la moelle épinière d'une souris transgénique exprimant la GFP (green fluorescent protein) dans la colonne

vertébrale d'une souris irradiée n'exprimant pas la GFP, le groupe de Badiavas et al.¹³⁴ a pu observer la migration des cellules souches hématopoïétiques vers la plaie cutanée, ainsi que leur différenciation en structure non-hématopoïétique de la peau. Il semblerait qu'il y ait, dans la blessure cutanée, les stimuli nécessaires à la migration et différenciation des cellules souches impliquées dans la régénération tissulaire. De plus, des cellules souches multipotentes (différentes des cellules souches mésenchymateuses) ont été isolées directement du derme de la peau de souris.¹³⁵ Il a été démontré que ces cellules pouvaient proliférer et se différencier en neurones, cellules gliales, cellules musculaires lisses ainsi qu'en adipocytes en réponse aux stimuli appropriés (lors d'une blessure cutanée par exemple).

1.7.6.1 Cellules souches pluripotentes au niveau des muscles squelettiques

La présence de cellules souches pluripotentes (CSPP) a été démontrée dans les muscles squelettiques (gastrocnemius et flexor digitorum) de rats.¹³⁶ Dans cette étude, on démontra la potentialité de ces cellules à se différencier en cellules neuronales et gliales (astrocytes et oligodendrocytes) en mettant les CSPP dans le milieu de culture approprié (milieu neurobasal avec du N2 ou du B27, et soit du NT3 ou du BDNF). D'autre part, une étude effectuée par le groupe de Galli et al.¹³⁷ a démontré qu'il était possible, à partir de CSN, de produire des myotubules squelettiques *in vitro* et *in vivo* lorsque ces cellules sont en contact direct avec des myoblastes. De plus, deux études faites dans le cœur ont également démontré qu'il était possible de régénérer partiellement le myocarde suite à un infarctus grâce aux cellules souches.¹³⁸⁻¹³⁹ Il est

donc une fois de plus démontré que lorsque soumis aux bons signaux épigénétiques, les cellules souches peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire des trois couches germinales.

1.7.6.2 Facteurs pouvant induire la différenciation des cellules souches

Le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) semble être, à lui seul, suffisant pour induire une différenciation des CSN en neurones et cellules gliales.¹⁴⁰ Par contre, il semblerait que plusieurs autres facteurs, dont l'acide rétinoïque (RA) et le NGF, potentialiseraient cette différenciation.¹⁴⁰

Tous les facteurs neurotrophiques peuvent, à un degré moins élevé chez l'adulte que chez l'embryon en développement, induire la différenciation des cellules souches en CSN. Le CNTF (ciliary neurotrophic factor) et NGF semblent de plus jouer un rôle particulièrement important dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

1.7.6.3 Facteurs pouvant stimuler la migration des cellules souches dans un tissu cible

Il a été démontré par plusieurs études qu'il y aurait, dans la majorité des tissus, des cellules souches qui y résideraient en permanence. Par contre, il semblerait que ces cellules seraient en nombre insuffisant pour régénérer une grande zone lésée (comme dans le cas de l'infarctus du myocarde par exemple).¹⁴¹ Par conséquent, plusieurs données montrent que le tissu blessé pourrait exprimer les récepteurs ou ligands appropriés pour faciliter le trafic et l'adhésion des cellules souches au site de blessure.

La présence de c-kit (un récepteur à tyrosine kinase; il est nommé CD117 chez l'humain) et de son ligand SCF (facteur des cellules souches) a d'ailleurs été démontré au niveau du cœur. D'ailleurs, on a retrouvé l'expression de l'ARNm de SCF dans les fibroblastes myocardiques adultes, ainsi que dans les macrophages. Le SCF semblerait également augmenter l'expression de CXCR4 (un récepteur de chemokines) dans les cellules souches, qui seront alors plus sensibles aux concentrations de son ligand SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) libéré au niveau du tissu cible. La cytokine G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) semble également être un facteur chemoattractif pour les cellules souches. Il existe probablement beaucoup d'autres facteurs (dont 6-Ckine) et protéines d'ancrage libérés au site de blessure et participant à la migration des cellules souches impliquées dans la réparation tissulaire, mais beaucoup reste à découvrir dans ce domaine.

Basé sur ces observations, il est maintenant possible de penser qu'un type de cellule ectopique à un tissu puisse s'y retrouver, grâce à l'hypothèse de la plasticité cellulaire. De plus, il a été démontré que des populations de cellules souches pouvaient résider au sein d'un tissu, et pourrait, sous l'influence de facteurs appropriés, se différencier en n'importe quel type de cellules des trois lignées germinales. On peut donc penser que, dans le cas de l'étude faite par Vracko et al., la régénération des fibres nerveuses détruites par la blessure cardiaque, de même que la multiplication des fibres nerveuses dans la zone ischémique pourraient être expliquées, en partie, par cette théorie de la plasticité cellulaire, ou par la présence de cellules souches.

Objectifs et hypothèses

L'objectif général du présent mémoire est le suivant : déterminer si la guérison cicatricielle post-infarctus est associée à une innervation neuronale. Cet objectif repose principalement sur les études faites au niveau de la cicatrice cutanée. On veut savoir en quoi les deux types cicatriciels sont comparables quant à la présence de cellules nerveuses, de facteurs neurotrophiques, et de cellules souches. Ce travail sera principalement descriptif, afin de caractériser des populations cellulaires qui n'ont jamais été identifiées au sein du tissu cardiaque.

Le travail qui suit tentera de répondre aux questions suivantes :

- Y a-t-il présence de neurones dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde?
- La zone cicatricielle contient-elle les facteurs propices à la présence d'une population cellulaire neuronale (facteurs neurotrophiques)?
- Dans le cas advenant, est-ce que la présence de neurones dans la cicatrice pourrait être expliquée par l'implication d'une population de cellules progénitrices?

Chapitre 2

Matériels et méthodes

2.1 Culture cellulaire

2.1.1 Culture des fibroblastes cardiaques cicatriciels de rats

On a tout d'abord induit des infarctus du myocarde à des rats mâles Spragues-Dawley âgés de 8 à 10 semaines (200-250g) provenant de chez Charles River Laboratories. Les infarctus ont été causés par la ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche via thoracotomie. L'anesthésie chez les rats est effectuée avec un mélange gazeux d'oxygène/halothane 3% qui est réduit progressivement jusqu'à 1% lors de la ligature. Le taux de mortalité de cette chirurgie dans les 24 heures suivant l'opération se situe autour de 50%. Une semaine après la chirurgie, on ré-anesthésie les rats préopérés à l'aide d'une solution de kétamine (50 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg), on prend les données hémodynamiques puis prélève et pèse les cœurs. En ce qui a trait à chaque cœur, les cicatrices sont découpées et pesées, puis 5 à 6 cicatrices de grosseurs variables sont mises ensemble, découpées, puis digérées avec une solution de trypsine 0.1% (GIBCO BRL) dans du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, sans Ca^{2+} ; GIBCO BRL) pendant une nuit, sous agitation, à 4°C. Le lendemain, la première réaction de digestion est arrêtée par l'ajout de sérum (solution de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enrichi de Fetal Bovine Serum (FBS) 7% avec de la pénicilline et de la streptomycine), puis une seconde série de digestion sera effectuée à l'aide de solutions de collagénase type II 0.1% (GIBCO BRL), jusqu'à digestion complète des tissus. Chacune de ces incubations permet de briser les fibres de collagène, libérant ainsi les cellules formant la cicatrice. Une fois le tissu digéré, les cellules en suspension (récoltée dans le surnageant) seront centrifugées à 4°C, à une vitesse de 2000 rpm pendant 2 à 5 minutes, puis seront resuspendues dans du HBSS

pour être lavées une fois, et enfin seront resuspendues dans 30 mL de milieu de culture (DMEM enrichi de FBS 7%) et mises en culture dans trois ou quatre flacons T75 (avec environs 7 mL de suspension cellulaire/T75) ainsi que dans un ou deux P12 contenant des lamelles de microscope dans le fond de chaque puits (250 μ L de suspension cellulaire/puit), préalablement préparé pour l'immunofluorescence. Il faudra plusieurs heures à quelques jours avant que toutes les cellules s'accrochent au fond des flacons et/ou lamelles. Les cellules pousseront jusqu'à confluence dans les T75 (5 à 7 jours). À ce moment, les cellules seront décollées du fond du flacon à l'aide d'une solution de trypsine 0.25% (GIBCO BRL) et redistribuées dans d'autres P12 (pour l'immunofluorescence) ou dans des P100 (pour les dosages d'ARN ou de protéines), à une densité de 100-200 cellules/mm². Les cellules seront décollées et remis en culture dans de nouveaux pétris (passagée) une seule fois, car des passages ultérieurs risqueraient de changer le phénotype des cellules. Le milieu de culture des cellules est changé à tous les deux jours et l'incubation se fait à 37°C avec 5% CO₂.

2.1.2 Culture des cellules de phéochromocytome (PC12) et traitement avec le surnageant de la culture de cellules cicatricielles de passage primaire

Les cellules de phéochromocytome PC12 (ATCC) ont initialement poussé dans un flacon T75 contenant du milieu F12-K (Gibco) supplémenté de sérum de cheval (15%), de FBS (2.5%) et de bicarbonate de soude (1.5g/L), puis ont ensuite été transférées sur des lamelles de microscope prétraitées avec du collagène type I (10mg/100mL). Le surnageant d'une culture de cellules cicatricielle de passage primaire 8-10 jours après sa mise en culture initiale avait été préalablement récolté,

puis appliqué sur la culture de cellules PC12 pour une période de 5 jours. Cette expérience a été effectuée deux fois, avec des surnageants de cellules cicatricielles récoltées lors de cultures différentes. L'effet du FBS (7%) a été testé sur ces cellules, et aucune différenciation n'a été observée suite à son application. Les cellules ont été fixées sur les lamelles, des photos en contraste de phase ont été prises, et la différenciation a été examinée via la réorganisation de neurofilaments-M (voir protocole de l'immunofluorescence).

2.1.3 Culture des fibroblastes NIH 3T3

Ces cellules ont été reçues au 6^e passage; les passages 7 et 8 ont été utilisés lors de nos expérimentations. Les fibroblastes NIH 3T3 ont initialement poussé dans un flacon T75 contenant du milieu DMEM supplémenté de FBS (10%) et de glucose (4g/L) afin d'avoir un milieu riche en glucose, puis ont ensuite été transférés sur des lamelles de microscope. Elles ont ensuite été fixées sur les lamelles avec une solution de paraformaldéhyde 4%, puis on a procédé au marquage pour l'immunofluorescence (voir plus bas).

2.2 Immunofluorescence

2.2.1 Cellules en culture

Pour l'immunofluorescence, on fait pousser les cellules sur des lamelles de microscope préalablement déposées dans le fond des puits de P12. Une fois la densité de cellule désirée obtenue (pas confluent, mais avec une densité assez importante), les

cellules sont fixées aux lamelles suite à un traitement à la paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. On effectue ensuite un rinçage des lamelles avec une solution d'ammonium chloride 50mM pendant 10 minutes, afin de neutraliser toute la paraformaldéhyde restante. On lave ensuite trois fois les lamelles avec du tampon PBS 1X filtré à 5 μ m, pH 7.4, puis on peut ensuite soit stocker les cellules à -20°C (dans une solution 50% PBS-glycérol), soit débiter le protocole de marquage cellulaire.

Une première étape de perméabilisation membranaire et de blocage des sites non-spécifiques est effectuée à l'aide d'une solution de PBS 1X filtré - BSA 2% - triton X-100 0.2% pendant une période d'environ une heure, à la température de la pièce. Environ 5-10 minutes avant la fin de l'incubation, les dilutions d'anticorps doivent être préparées (voir Tableau 2.1 pour la dilution de chaque anticorps utilisé), puis chaque lamelle est installée sur un morceau de parafilm, cellules vers le haut, dans une boîte étanche contenant un morceau de papier humide. On dépose ensuite à la surface de chaque lamelle 150-200 μ l de l'anticorps dilué approprié, de manière à former une bulle. La boîte est finalement déposée délicatement à 4°C pour la nuit.

Le lendemain, les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X, puis incubées pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire approprié (réf Tableau 2.1), à la température de la pièce, dans le noir. Trois derniers lavages sont effectués avec du PBS 1X, puis les lames sont montées avec 8 μ l de milieu de montage (solution de DABCO-glycérol 20%) et finalement scellées avec du vernis à ongle.

Les lames sont par la suite observées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence LSM 510 de Zeiss (Axiovert 100M). Un laser à l'argon émettant une longueur d'onde de 488 nm est utilisé pour percevoir les marquages au FITC, et un laser au He/Ne émettant une longueur d'onde de 543 nm est utilisé pour les marquages à la rhodamine ou à la phalloïdine/Texas Red. Les photos sont prises à l'aide d'un objectif 63X avec une ouverture numérique de 1.4.

Pour ce qui est de l'interprétation des résultats obtenus, lorsqu'on compare l'intensité d'expression d'une protéine observée par immunofluorescence sur des photos différentes, les paramètres des lasers et du logiciel seront conservés.

2.2.2 Préparation et marquage des coupes tissulaires de cœur (Cryostat)

L'immunofluorescence a également été faite sur des coupes au cryostat de cœurs gelés. Les cœurs sont donc prélevés une semaine après l'infarctus, de la même manière que pour les cultures cellulaires classiques. Immédiatement après son prélèvement, le cœur est déposé dans le 2-méthyl-butane (SIGMA) préalablement refroidi dans de l'azote liquide (pour permettre une congélation extrêmement rapide) puis sera conservé à -80°C. Des coupes de 14 µm des ventricules gauches préalablement enrobés dans un milieu d'enrobage OCT (Optimal cutting temperature) sont ensuite effectuées au cryostat et déposées sur des lames de microscope, puis également conservées à -80°C. Pour l'immunofluorescence, c'est le même protocole que celui utilisé pour la culture cellulaire, mais la préparation tissulaire était préalablement encerclée à l'aide d'un Pap-Pen (crayon à encre hydrophobe; ZYMED Laboratories Inc.) pour restreindre les liquides sur les tissus.

Tableau 2.1 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

Anticorps	Hôte	Format	Compagnie	Numéro de catalogue	Concentration de l'anticorps	Dilution utilisée
Smooth muscle α -actin	Souris	Monoclonal; ascites fluid	sigma	A2547	26 mg/ml	1 : 250
Vimentin	Souris	Monoclonal; ascites fluid	sigma	V6630	-	1 : 200
Nerve Growth factor-beta (NGF- β)	Lapin	Polyclonal; immunoglobuline purifiée	Chemicon	AB1526SP	1mg/ml; 500 μ l	1 : 300
Neurofilament M (145 kD), C-terminal (NFM)	Lapin	Polyclonal; antisérum	Chemicon	AB1987	-	1 : 1000
Peripherin	Lapin	Polyclonal; antisérum	Chemicon	AB1530	-	1 : 1000
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Lapin	IgG fraction de l'antisérum	sigma	G9269	11.9 mg/ml	1 : 1000
Growth associated protein 43 (GAP-43)	Lapin	Polyclonal; sérum	Chemicon	AB5312	-	
P75 NGF receptor	Lapin	Polyclonal; sérum	Chemicon	AB1554	-	1 : 300
Trk A	Lapin	Polyclonal; antisérum	BD PharMingen	556603	-	1 : 1000
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	Lapin	Polyclonal; sérum	Chemicon	AB1779	-	1 : 500
Myelin/oligodendrocyte specific protein (MOSP)	Souris	Monoclonal; ascites fluid	Chemicon	MAB328	-	1 : 400
Nestin	Souris	Monoclonal; immunoglobuline purifiée	Chemicon	MAB353	1.02mg/ml	1 : 400
Tyrosine hydroxylase	Souris	Monoclonal; ascites fluid	Chemicon	MAB318	-	1 : 500
Rhodamine	Chèvre Anti-souris	IgG conjugué à la rhodamine	Molecular Probes	A11003	2 mg/ml	1 : 500
Fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (FITC)	Chèvre Anti-lapin	IgG conjugué au FITC	Jackson Laboratories	111-095-003	2 mg	1 : 500
Horse radish peroxidase conjugated goat anti-rabbit (HRP)	Chèvre Anti-lapin	IgG conjugué au HRP; anticorps secondaire	Santa Cruz Biotech.	Sc-2004	400 μ g/ml	1 : 20 000

2.3 Analyse de l'expression du NGF par Immunobuvardage

Les cellules utilisées pour les analyses par Immunobuvardage sont initialement mises en culture dans des flacons T75 jusqu'à l'obtention de la confluence cellulaire. Elles sont ensuite passagées avec une solution de trypsine/EDTA (0.25%, 0.53 mM), puis remises en culture dans des pétris P100 avec une densité initiale de 200 cellules/mm² dans du DMEM supplémenté de FBS 7%, et ce, jusqu'à confluence. Le milieu est

ensuite remplacé pour une période de deux jours par le même milieu sans sérum (avec de l'ITS). Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS (pH 7.4, 4°C), puis sont lysées avec un tampon de lyse contenant du TRIS pH 7.5 10mM, du NaCl 150 mM, de l'EDTA 1mM, de l'EGTA 1mM, du NaF 50mM, du triton X-100 1%, du Nonidet P-40 0.5%, du vanadate 1mM, du phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0.5 mM, de la leupeptine 1µg/mL et de l'aprotinine 1µg/mL. La concentration de protéine est ensuite mesurée par la méthode de Bradford. Cent µg de protéines de chaque échantillon sont ensuite précipités à l'acétone (à -20°C pendant au moins 30 minutes), bouilli pendant 5 minutes (dénaturation des protéines) puis sont séparés sur un gel de SDS-polyacrylamide 10% par électrophorèse. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Hybond) à 100V (ou 300mA) pendant 1h30 à 4°C. Une coloration au rouge Ponceau S est ensuite effectuée pour vérifier l'égalité des concentrations de protéines entre les différents puits. Suite à cette vérification, la membrane est soumise à un traitement de blocage des sites non spécifiques (PBS-T 1X avec 5% de lait en poudre, ou 5% de BSA lors d'utilisation d'anticorps dirigés contre une protéine phosphorylée), suivi par un marquage primaire de NGF-β (1:500 dans la même solution que celle du blocage; Chemicon), un marquage secondaire avec un anticorps couplé au HRP (goat anti-rabbit 1 : 20 000; Santa Cruz) incubé pendant une heure à la température de la pièce, puis la visualisation des bandes est effectuée par chémiluminescence suite à un traitement avec le kit de détection ECL (Amersham Canada Limited).

2.4 Mesure par ELISA du NGF sécrété par une culture de cellules cicatricielle d'une semaine post-infarctus

Le NGF biologiquement actif sécrété dans le surnageant d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus de passage primaire a été quantifié par la méthode d'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay; Chemicon). Quatre jours après à la mise en culture initiale (temps minimal laissé aux cellules cicatricielles pour bien se fixer au fond des P100 et commencer à se multiplier), 500µL de nouveau milieu de culture (DMEM avec 7% FBS) a été ajouté et ce moment a été défini comme étant le jour 0. Les surnageants des jours 2 à 7 ont été ensuite prélevés et les concentrations de NGF ont été déterminées par ELISA. Cette expérimentation a été répétée 3-4 fois pour chaque Jours. La concentration de NGF dans le milieu de culture basal a également été mesuré, amis sa présence n'a été décelée.

2.5 Mesure de l'ARNm par RT-PCR

Un RT-PCR (Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction) a été effectué sur l'ARN total de la cicatrice cardiaque (tissu), sur des cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus en culture ainsi que sur des myocytes cardiaques néonataux en culture. Les brins d'ADN (primers) utilisés pour amplifier la tyrosine hydroxylase était codé ainsi : 5'-CGCTGAAGGGCCTCTATGCTAC-3' (bon sens) et 5'-GCATGGCGGARARACTGGGTG-3' (sens inverse), et donnera un produit de la PCR de 238 paires de bases. La technique utilisée est la même que celle retrouvée dans la littérature.¹⁴²

Chapitre 3

Résultats

3.1 Première partie :
Caractérisation d'une culture de cellules cicatricielles
d'une semaine post-infarctus.

La première étape était de présenter la culture cellulaire cicatricielle de rats d'une semaine post-IM telle que nous la voyions en microscopie à contraste de phase à différents temps. Puisque la dite culture cellulaire n'est pas pure, i.e. qu'elle contient plus d'une sorte de cellules, nous avons tenté de définir ces populations de manière qualitative, par une description morphologique, suivi d'une caractérisation plus approfondie en microscopie confocale à fluorescence à l'aide de marqueurs spécifiques. Dans cette section, seuls les myofibroblastes seront caractérisés par immunofluorescence.

Figure 3.1 : Cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus

La figure 3.1 illustre la variété cellulaire retrouvée dans nos cultures de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus, après 6-9 jours en culture. Ces photos ont été prises en contraste de phase avec un objectif de 20X (A-D) et les photos B et D ont été agrandies grâce au logiciel informatique Adobe Photoshop 6.0. La culture comprend deux groupes de cellules morphologiquement différentes : le type cellulaire majoritaire est formé par les myofibroblastes, très aplatis, de faible densité, de forme irrégulière avec une luminosité pauvre. Le second type cellulaire a plutôt une morphologie neuronale, pourvue d'un corps cellulaire beaucoup plus rond, plus lumineux, d'une densité plus importante. Ces cellules sont plus petites, et possèdent des prolongements membranaires rappelant les neurites d'un neurone. À plus fort grossissement (figure 3.1B, flèche), il est même possible d'observer des contacts entre les cellules. Lorsque laissées 14 jours en culture (figure 3.1C), les cellules d'aspect

neuronal semblent avoir augmenté en nombre (la densité cellulaire d'un champ microscopique semble plus importante), en plus de s'être rassemblées au même endroit, formant une pseudo-crête traversant de part et d'autre le puits du P12 dans lequel elles ont été mises en culture.

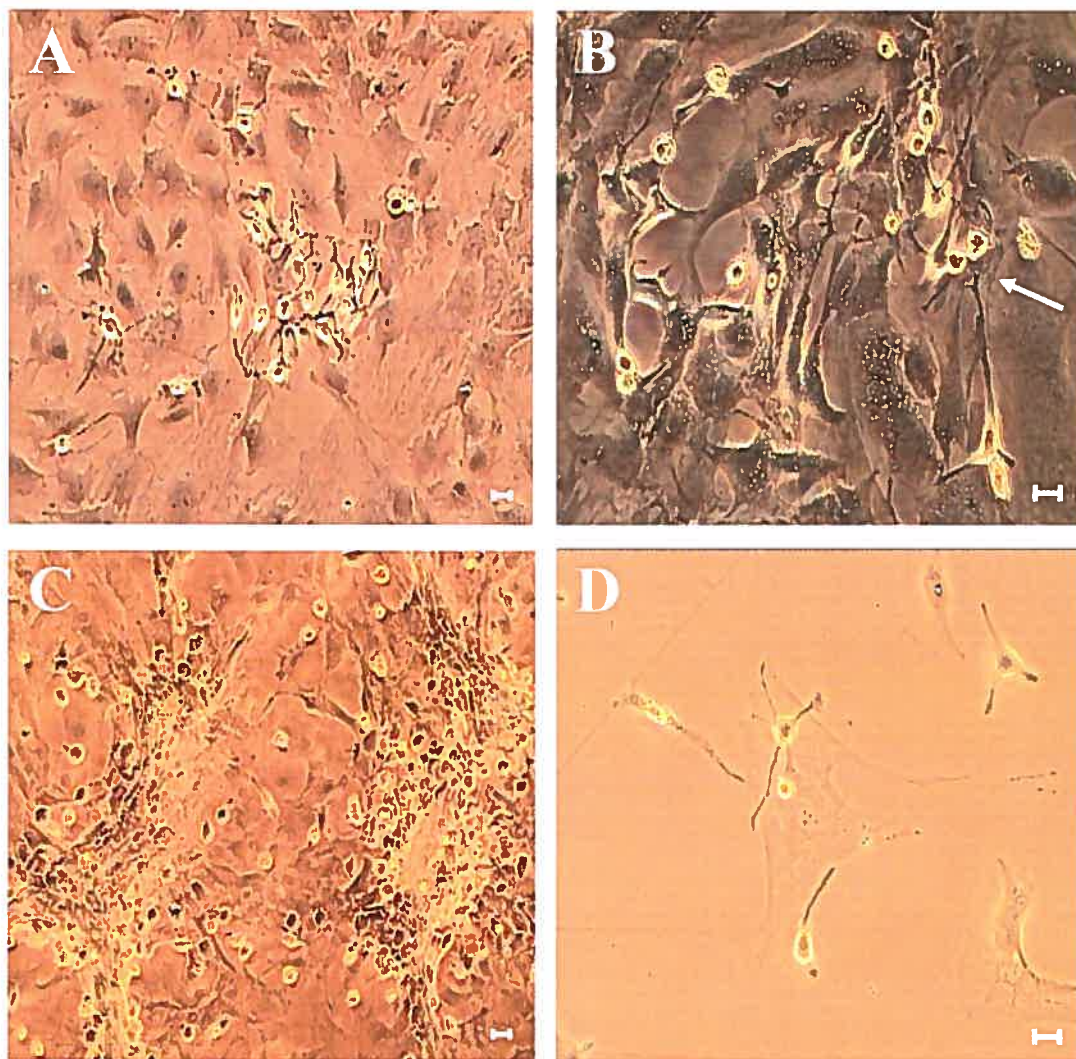


Figure 3.1 : Culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus. A-B Cellules d'aspect neuronal avec prolongements membranaires et contact entre les cellules (flèche) observées 6-9 jours après la mise en culture (100-200X). C Agrégats de cellules d'aspect neuronal 14 jours après la mise en culture : formation de crêtes (100X). D Cellules d'aspect neuronal et myofibroblastes à fort grossissement (200X).

Figure 3.2 : Myofibroblastes présents dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus d'une semaine.

Les myofibroblastes retrouvés dans la cicatrice cardiaque peuvent être caractérisés par immunofluorescence par différents marqueurs spécifiques tels que la SMA (smooth muscle α -actin)(figure 3.2A) et la vimentin (figure 3.2B). Ces deux photos ont été prises en microscopie confocale à un grossissement de 63X et démontrent l'organisation des deux types de filaments intermédiaires dans les myofibroblastes en culture.

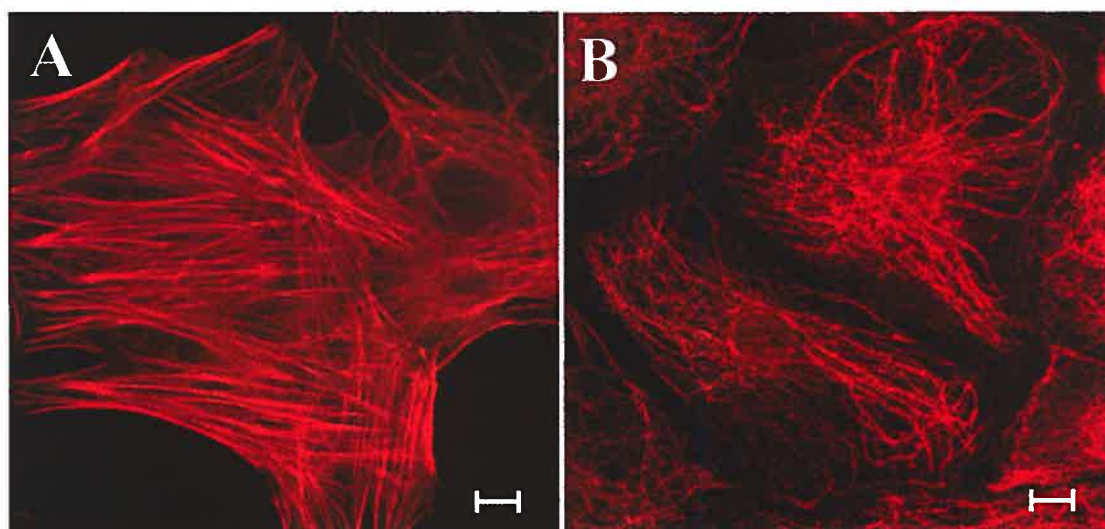


Figure 3.2 : Myofibroblastes présents dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus d'une semaine. A Marquage de la SMA et B de la vimentin (63X). Échelle : 10 μ m

3.2 Deuxième partie :

Caractérisation de la population cellulaire ectopique (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus.

En second lieu, on a tenté de caractériser la population cellulaire ectopique. Puisque ces cellules ont une morphologie neuronale, et que la littérature retrouvée au niveau de la cicatrice cutanée suggère l'implication de cellules nerveuses dans le processus de guérison via la sécrétion de NGF, on a voulu savoir si ce phénomène était répété au niveau de la cicatrice cardiaque. On a tout d'abord tenté de savoir si ce facteur neurotrophique était produit dans la cicatrice cardiaque, et quelles cellules étaient impliquées dans cette production. On a également regardé un second facteur neurotrophique, le BDNF, qui pourrait également être impliqué dans ce phénomène.

Figure 3.3 : Expression du facteur de croissance neuronal (NGF) et du facteur de croissance dérivé du cerveau (BDNF) par une culture de cellules cicatricielles.

Les protéines NGF (nerve growth factor) et BDNF (brain-derived neurotrophic factor) font partie de la famille des facteurs neurotrophiques impliqués dans la survie et la différenciation des cellules neuronales. Les figures 3.3A et B montrent les myofibroblastes exprimant la protéine NGF selon deux patrons d'expression différents : en A, le NGF semble suivre les filaments d'actine dans le cytoplasme, en plus d'avoir un marquage nucléaire granulaire de forte intensité. En B, le patron d'expression au niveau cytoplasmique semble être moins bien organisé, avec un signal granulaire plus diffus, ainsi qu'un signal nucléaire granulaire moins fort. Les cellules ayant une morphologie neuronale expriment également cette protéine, avec une organisation filamenteuse au niveau des prolongements membranaires et un marquage nucléaire/périnucléaire granulaire (figure 3.3C). Pour BDNF, un signal cytoplasmique

granulaire est détecté dans les cellules d'aspect neuronal, en plus d'être localisé dans les prolongements membranaires. Un marquage granulaire plus modeste dans la région périnucléaire des myofibroblastes peut également être observé (figure 3.3D). La protéine NGF a également été détectée par immunobuvardage par les cellules cicatricielles, mais également par les cellules ventriculaires de la zone non-infarctée (NILV; non-infarcted left ventricle; intensité plus faible) ainsi qu'au niveau des fibroblastes ventriculaires de cœur normal (intensité variable) (figure 3.3E). Les bandes à ~19 et ~27 kDa représentent respectivement les précurseurs prépro-NGF et le pro-NGF.

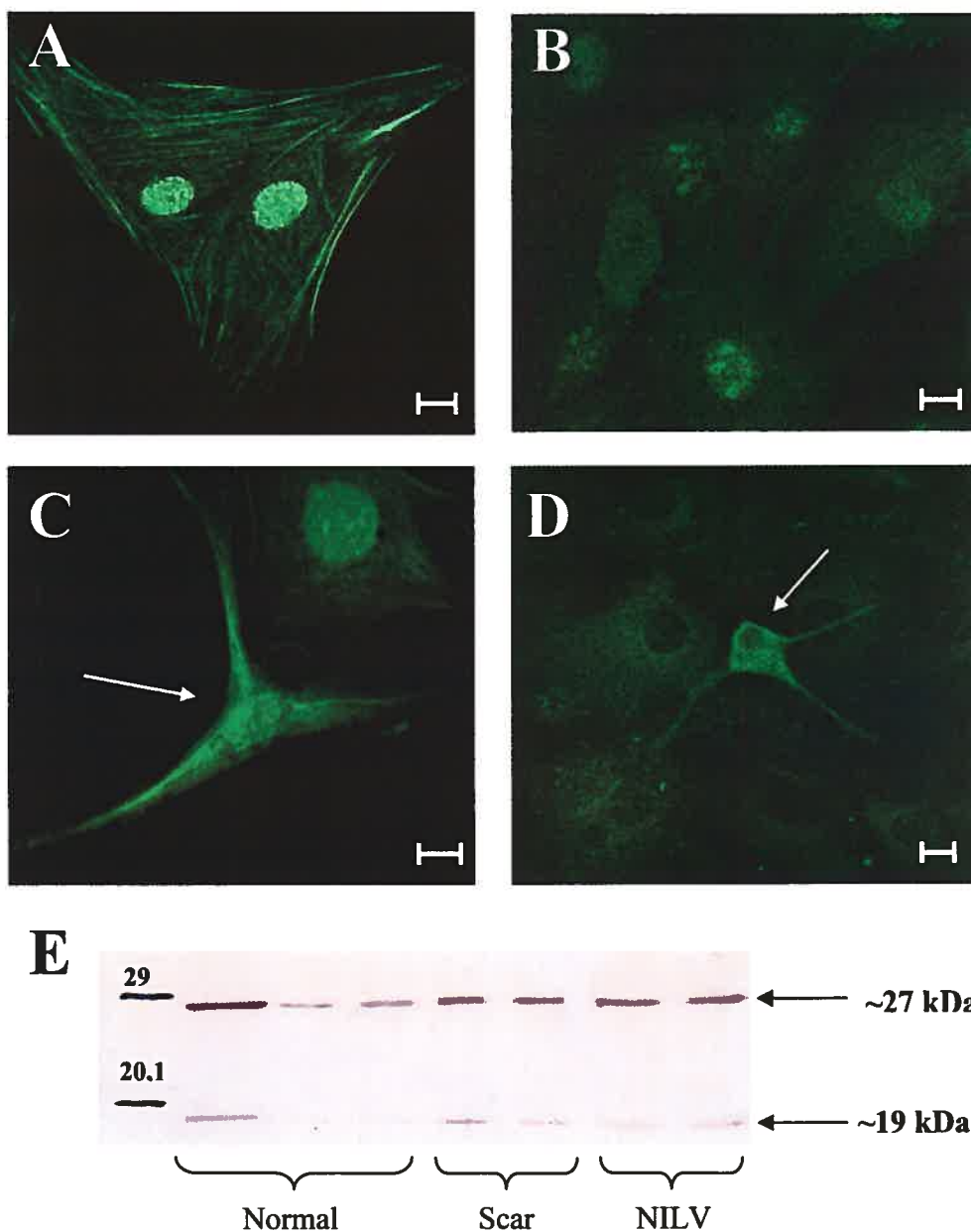


Figure 3.3 : Expression du facteur de croissance neuronal (NGF) et du facteur de croissance dérivé du cerveau (BDNF) dans une culture de cellules cicatricielles. A-B Détection de NGF dans les myofibroblastes au niveau nucléaire et suivant les filaments d'actine avec des intensités variables. **C** Immunoréactivité de NGF dans les types cellulaires neuronaux avec un marquage aux régions nucléaires/ périnucléaires ainsi que dans les prolongements membranaires. **D** Signal granulaire cytoplasmique de BDNF détecté dans le type neuronal, en plus d'un signal plus modeste dans la région périnucléaire des myofibroblastes. **E** Présence de la protéine NGF détectée par immunobuvardage dans des cellules ventriculaires de cœur normal (n=3), ainsi que des cellules de la zone infarctée (scar)(n=2) et non-infarctée (NILV)(n=2) d'un cœur post-infarctus d'une semaine. 63X Échelle : 10 μ m

Suite à ces résultats, nous devons vérifier quelles cellules possédaient les récepteurs de ces facteurs afin d'essayer de comprendre le rôle de cette production. Nous avons concentré notre étude uniquement sur le NGF, puisque nous savions déjà que ce facteur était impliqué dans le phénomène de cicatrisation cutané.

Figure 3.4 : Expression des récepteurs au NGF Trk-A et p75.

Deux récepteurs au NGF sont connus : le récepteur de grande affinité TrkA et le récepteur de faible affinité p75. Les deux types de récepteurs sont détectés par immunofluorescence dans les myofibroblastes et les cellules d'aspect neuronal. Les deux populations cellulaires possèdent un marquage granulaire membranaire et nucléaire.

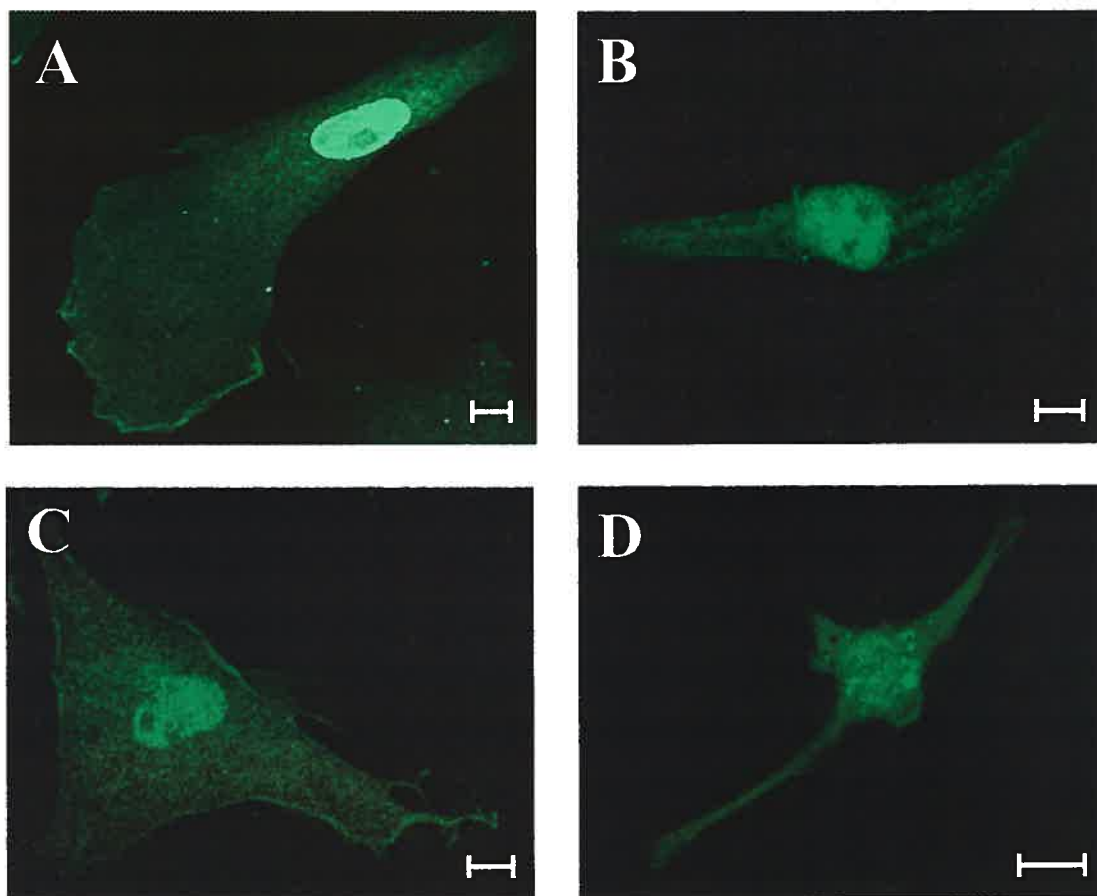


Figure 3.4 : Expression des récepteurs au NGF Trk-A et p75. Détection des récepteurs Trk-A et p75 au niveau du noyau et de la membrane plasmique des myofibroblastes A-C et des types cellulaires neuronaux B-D. (63X) Échelle : 10 μ m

Les questions suivantes qui se sont posées concernaient la sécrétion et l'activité du peptide. Est-ce que le NGF produit était libéré? Et avait-il une activité? En premier lieu, on a vérifié par ELISA si le peptide était sécrété dans le surnageant de nos cultures cellulaires. Dans la littérature, plusieurs types cellulaires connus ont la capacité de se différencier en présence de certains facteurs neurotrophiques. Les cellules de phéochromocytome étaient l'un de ces types cellulaires. C'est donc avec ces cellules que nous avons vérifié l'activité peptidique du NGF produit par nos cellules.

Figure 3.5 : Sécrétion de nerve growth factor (NGF) par une culture de cellules cicatricielles.

En plus d'être exprimée par les myofibroblastes et les cellules d'aspect neuronal, la forme biologiquement active du NGF a été détectée dans le surnageant d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus récolté aux jours 2 à 7 (figure 3.5).

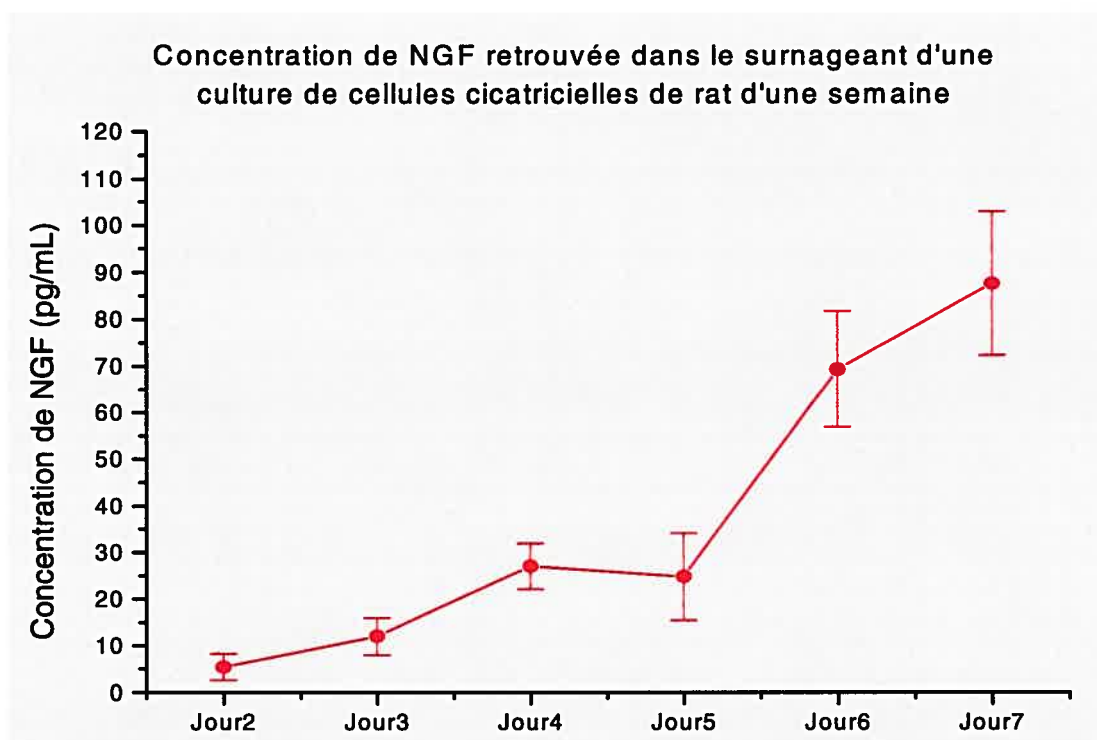
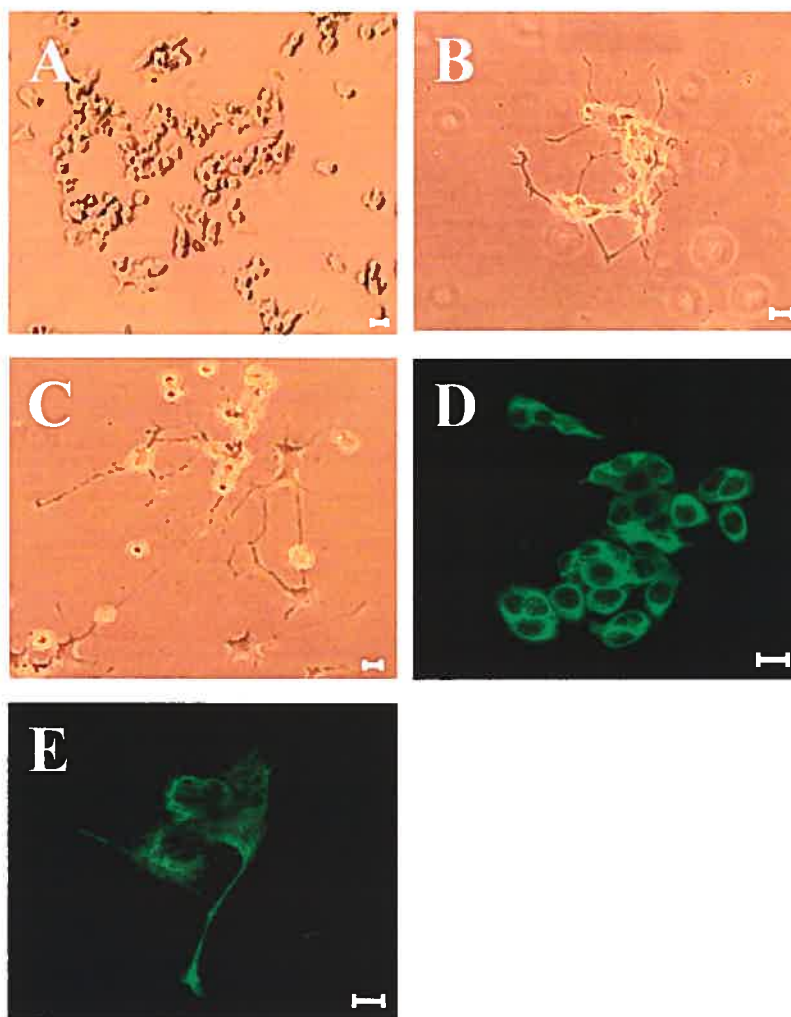


Figure 3.5 : Expression de nerve growth factor (NGF) dans une culture de cellules cicatricielles. Détection de NGF biologiquement actif par ELISA au niveau du surnageant d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine de premier passage après 2 à 7 jours en culture.

Figure 3.6 : Différenciation des cellules PC12 et réorganisation de la protéine neuronale neurofilament-M (NF-M; 145 kDa).

Afin de valider la présence de facteurs propices au développement de cellules neuronales au niveau de notre culture de cellules cicatricielles post-infarctus d'une semaine, des cellules de Phéochromocytome (PC12) ont été exposées au surnageant de nos cultures de cellules cicatricielles de passage primaire récolté aux jours 4-7, pour une période de 5 jours. La figure 3.6A présente les cellules PC12 non-stimulées et la figure 3.6B les cellules PC12 différenciées avec des prolongements membranaires suite à l'exposition au surnageant pendant une période de 5 jours. La figure 3.6C présente des cellules PC12 stimulées directement avec 50ng/ml de 2.5S NGF pour la même période de temps. On observe la même différenciation qu'avec le surnageant. La différenciation des PC12 est également accompagnée de l'organisation des neurofilaments-M au niveau du cytoplasme et des prolongements neuronaux (figure 3.6E) par rapport au basal (figure 3.6D). Une analyse quantitative permettant d'évaluer les prolongements membranaires suite à la différenciation des cellules PC12 après l'application des différents milieux a été faite sur 188 cellules stimulées au surnageant cellulaire, 30 cellules stimulées avec 50ng/ml de 2.5S NGF et 57 cellules stimulées avec 100ng/ml de 2.5S NGF. Cette analyse a été faite grâce au logiciel Adobe Photoshop 6.0 en déterminant le ratio des longueurs des neurites/corps cellulaires. Ces données se retrouvent dans le tableau F de la figure 3.6.



F

Stimulants	Ratio neurite/corps cellulaire	Nombre de cellules évaluées
Surnageant cellulaire	4.8 ± 0.54	n=188
2.5S NGF 50ng/ml	6.03 ± 0.68	n=30
2.5S NGF 100ng/ml	5.86 ± 0.37	n=57

Figure 3.6 : Différenciation des cellules PC12. A Photo prise en contraste de phase de cellules PC12 non-différenciées et B différenciées suite à l'application du surnageant récolté au jour 4-7 d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine; C différenciées lorsque stimulé directement avec 50ng/ml de NGF. D Expression de NF-M de manière diffuse et non-organisée chez les cellules PC12 non-différenciées. E Organisation de NF-M au niveau du cytoplasme et des prolongements membranaires chez les cellules PC12 différenciées suite au traitement avec le surnageant d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine F Tableau des ratio des longueurs des neurites/corps cellulaires des cellules PC12 selon les différentes conditions de stimulation. (63X) Échelle : 10µm

Suite à ces résultats, on a commencé à regarder différents marqueurs spécifiques aux neurones : des protéines ont été choisis, pour chaque classe de cellules retrouvée au niveau du SNC : la NF-M, la peripherin et la GAP-43 pour les neurones, la GFAP pour les astrocytes et la MOSP pour les oligodendrocytes. Ces protéines semblaient être les plus représentatives de ces types cellulaires, et exprimées de manière assez spécifique à chaque classe.

Figure 3.7 : Marquage spécifique de neurofilament-M (NF-M; 145 kDa).

Neurofilament-M (NF-M) étant une protéine qui est spécifiquement retrouvée dans les cellules neuronales adultes.¹⁴⁷ On peut observer au niveau des figures 3.7A et B un marquage positif retrouvé dans nos cellules d'aspect neuronal. Par contre, les neurones semblent avoir deux patrons d'expression différents : cytoplasmique avec des grains plus, ou moins bien définis. La protéine se retrouve également au niveau des neurites. De manière surprenante, on retrouve aussi un marquage positif de NF-M au niveau des myofibroblastes (figure 3.7C) avec des filaments organisés à des degrés variables. On n'obtient par contre aucun marquage de NF-M dans les fibroblastes NIH 3T3 (figure 3.7D) qui n'ont aucun lien avec l'environnement cicatriciel. Les différents paramètres (laser et logiciel) sont maintenus entre les photos afin de pouvoir les comparer.

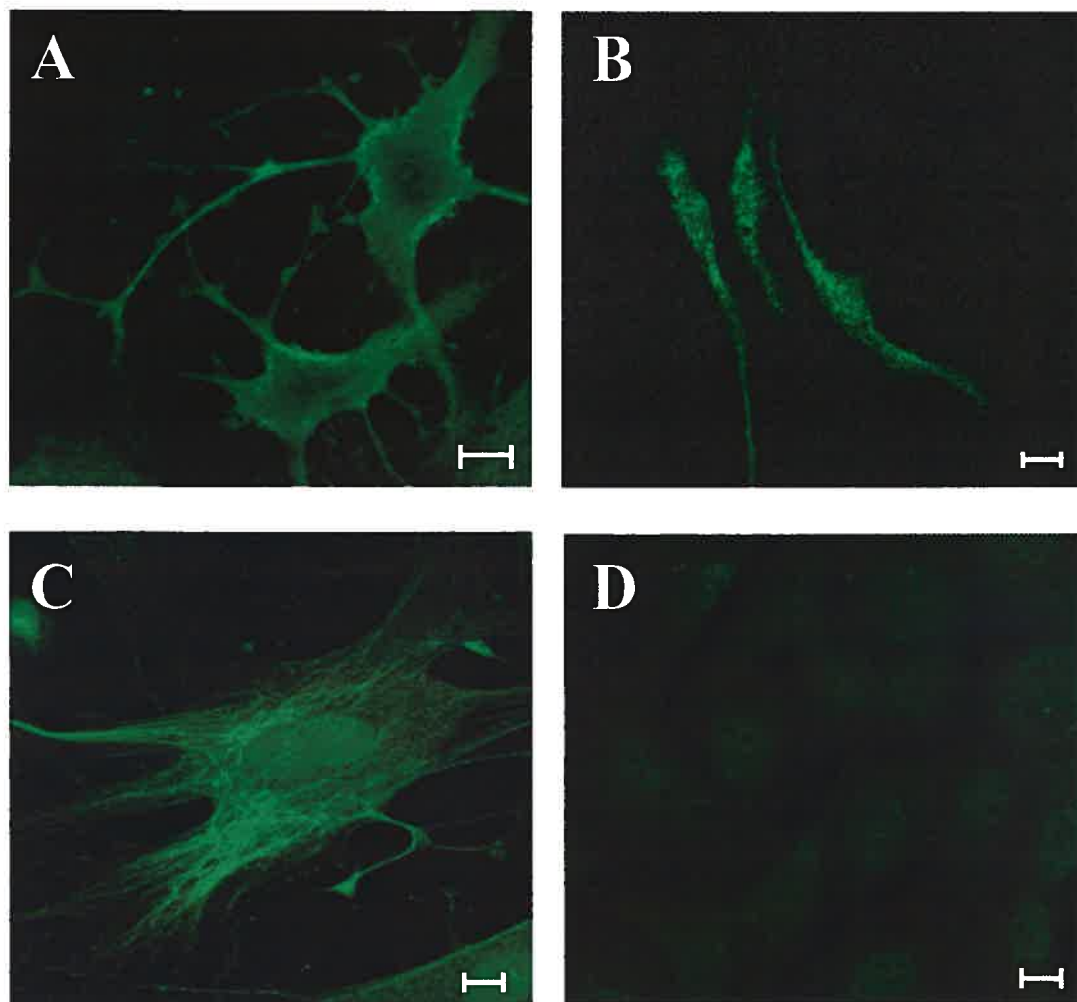


Figure 3.7 : Marquage spécifique de neurofilament-M (NF-M; 145 kDa). A-B Deux différents patrons d'expression de NF-M au niveau des neurones (cortical et granulaire cytoplasmique). **C** Expression de NF-M au niveau des myofibroblastes avec une organisation des filaments plus ou moins bien définie. **D** Population de fibroblastes NIH 3T3 n'exprimant pas la protéine spécifique aux neurones NF-M (63X). Échelle : 10 μ m

Figure 3.8 : Marquage spécifique de Peripherin.

La peripherin est également une protéine retrouvée uniquement dans les neurones du SNP adulte et du SNC en développement.⁸⁹⁻⁹⁰ On a obtenu un marquage positif avec des filaments plus ou moins bien définis tant dans nos cellules d'aspect neuronal (Figure 3.8A) que dans nos myofibroblastes (figure 3.8B). Aucun marquage nucléaire n'a été observé. On n'a également obtenu aucun marquage dans les fibroblastes NIH 3T3 (Figure 3.8C). Les différents paramètres (laser et logiciel) sont maintenus entre les photos afin de pouvoir les comparer.

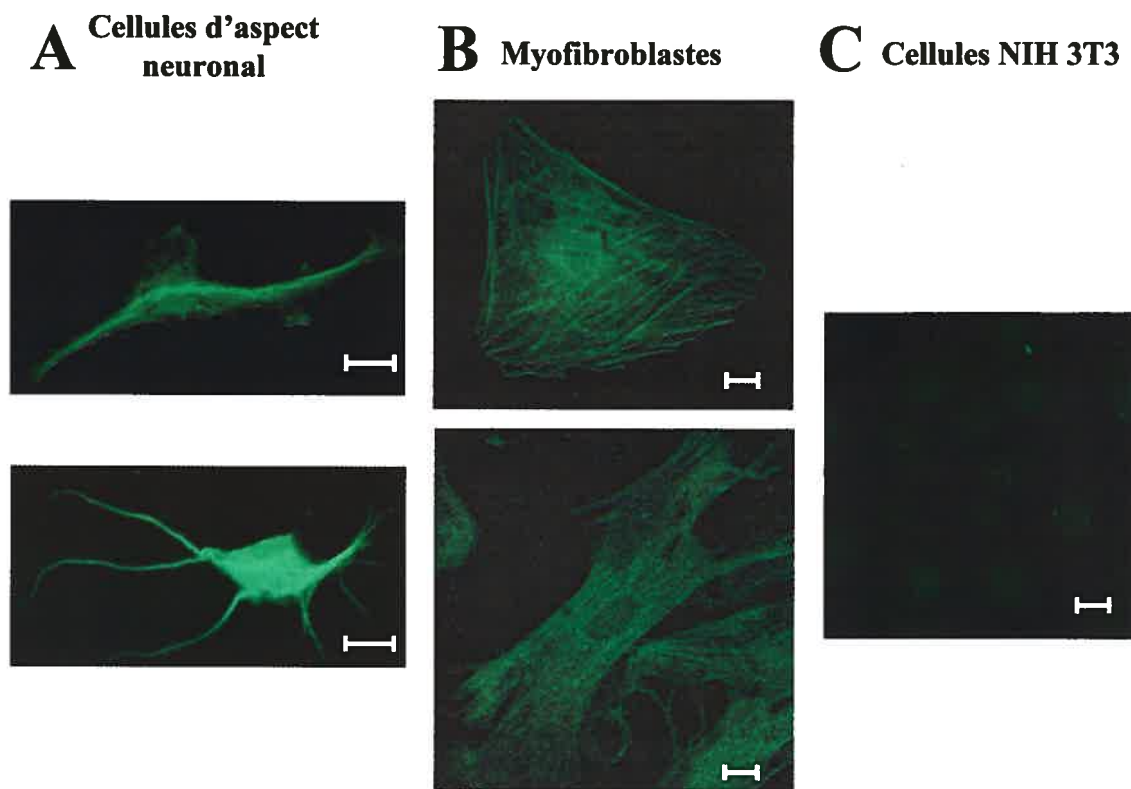


Figure 3.8 : Marquage spécifique de Peripherin. A Cellules d'aspect neuronal exprimant la protéine peripherin au niveau cytoplasmique. B Deux patrons d'expression distincts dans les myofibroblastes : cytoplasmique granulaire suivant ou non les filaments d'actine. C Population de fibroblastes NIH 3T3 n'exprimant pas la protéine spécifique aux neurones peripherin (63X). Échelle : 10 μ m

Figure 3.9 : Marquage de Growth-associated protein-43 (Gap-43).

Cette protéine est retrouvée principalement au niveau des cônes de croissance des neurones lors du développement de ces derniers dans le SNC et SNP.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰ Dans le cas présent, deux patrons d'expression différents ont été observés dans nos cellules d'aspect neuronal (figure 3.9A et B) : les deux neurones ont un marquage cytoplasmique granuleux mais l'expression de la protéine au niveau du noyau est variable (flèches).

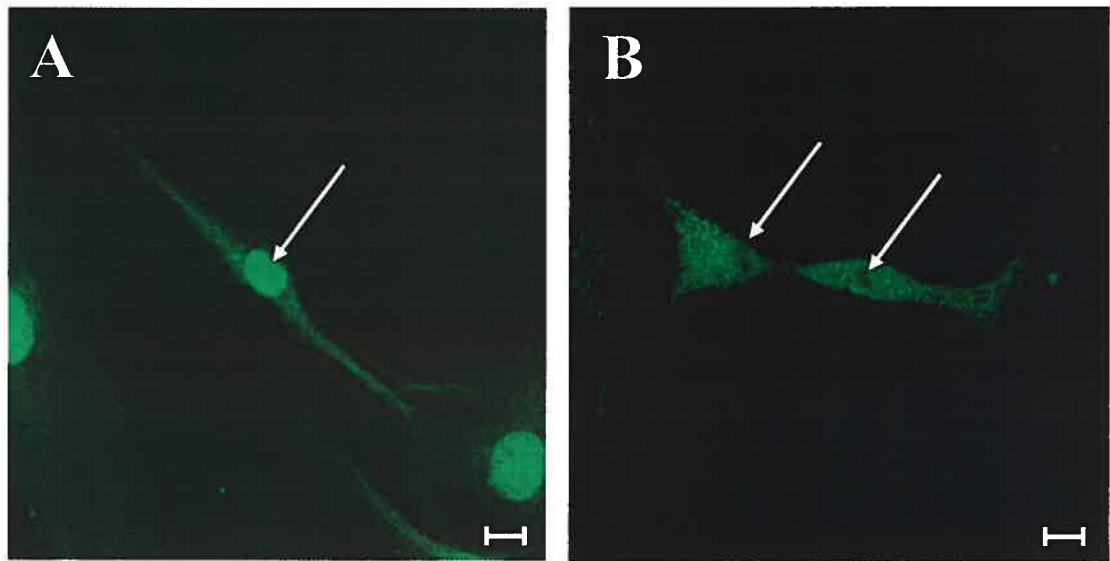


Figure 3.9 : Marquage de Growth-associated protein-43 (Gap-43). Deux différentes cellules d'aspect neuronal exprimant la protéine Gap-43 selon différents patrons : marquage cytoplasmique granulaire d'intensité variable avec A et sans B marquage nucléaire (flèches). (63X) Échelle : 10 μ m

Figure 3.10 : Marquage spécifique de Glial-fibrillary acidic protein (GFAP).

La protéine GFAP est principalement exprimée par les cellules gliales matures de la lignée astrocytaire.^{153, 155, 158-162} Son expression dans notre culture cellulaire nous démontre donc que notre groupe de cellules ectopiques d'aspect neuronal serait composé non seulement de neurones, mais également de cellules de la lignée gliale, ou d'astrocytes. Un marquage nucléaire fort et cytoplasmique granulaire est observé en ce qui a trait aux astrocytes (figure 3.10A), et deux patrons d'expression distincts sont présents au niveau des myofibroblastes (figure 3.10B) : cytoplasmique granulaire suivant ou non les filaments d'actine, avec un marquage nucléaire d'intensité variable. Toujours aucun marquage n'est observé dans les fibroblastes NIH 3T3 (figure 3.10C). Les différents paramètres (laser et logiciel) sont encore une fois maintenus entre les photos afin de pouvoir les comparer.

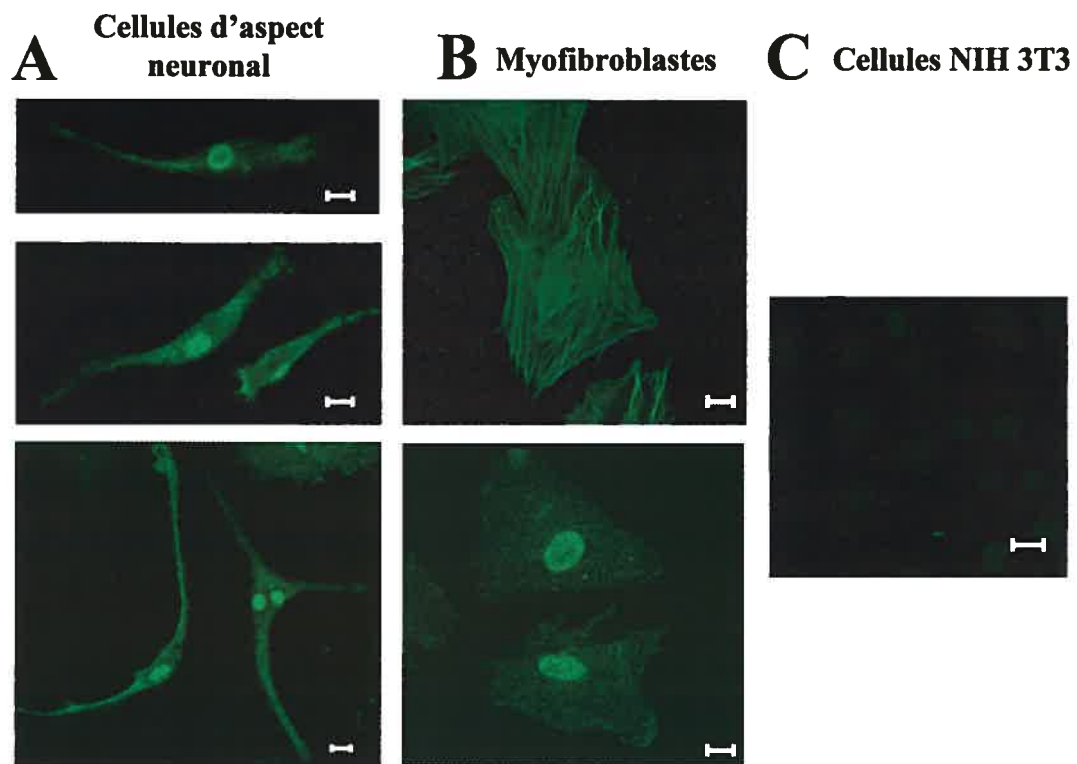


Figure 3.10 : Marquage spécifique de Glial-fibrillary acidic protein (GFAP). A Cellules d'aspect neuronal exprimant la protéine GFAP dans le cytoplasme et le noyau. B Deux patrons d'expression distincts dans les myofibroblastes : cytoplasmique granulaire suivant ou non les filaments d'actine, avec un marquage nucléaire d'intensité variable. C Population de fibroblastes NIH 3T3 n'exprimant pas la protéine spécifique aux astrocytes GFAP (63X). Échelle : 10 μ m

Figure 3.11 : Marquage spécifique de la Myelin-oligodendrocyte specific protein (MOSP).

Une seconde population de cellules de la lignée gliale a été identifiée dans nos cultures cellulaires : les oligodendrocytes, marqués par la protéine MOSP.¹⁷¹⁻¹⁷² Le marquage de ces cellules est cytoplasmique granuleux sans marquage au noyau (figure 3.11A et B). Cette protéine n'est, par contre, qu'exprimée très faiblement dans les myofibroblastes.

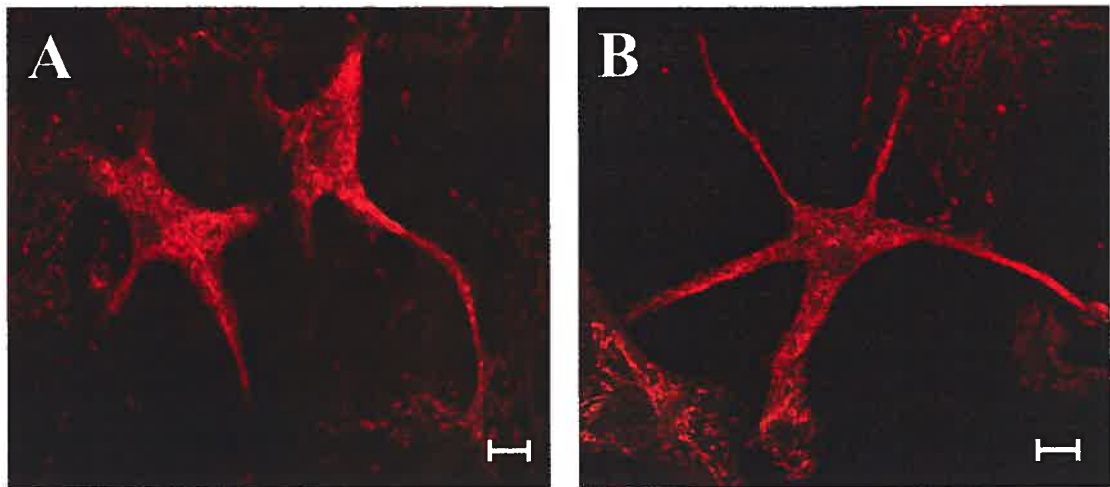


Figure 3.11 : Marquage spécifique de Myelin-oligodendrocyte specific protein (MOSP). A-B Trois oligodendrocytes ayant un marquage cytoplasmique granulaire sans marquage nucléaire. La protéine se trouve également dans les prolongements membranaires. (63X) Échelle : 10 μ m

Figure 3.12 : Expression de la tyrosine hydroxylase dans les cellules neuronales au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine.

Les neurones sympathiques matures expriment l'enzyme tyrosine hydroxylase, qui est impliquée dans la synthèse des catécholamines (conversion de la tyrosine en dopa). La présence de cette protéine dans nos cellules d'aspect neuronal nous donne donc de l'information sur le type de neurones qui peut être présent, en plus de suggérer un rôle de ces neurones dans la cicatrice. Il a donc été possible d'identifier par PCR la présence de l'ARNm de la tyrosine hydroxylase (figure 3.12A), en plus d'identifier par immunofluorescence sa présence dans les cellules neuronales (figure 3.12C), en colocalisation avec la protéine peripherin (figure 3.12B). Son expression est principalement localisée dans la région périnucléaire, en plus d'avoir un signal cytoplasmique et nucléaire granuleux diffus.

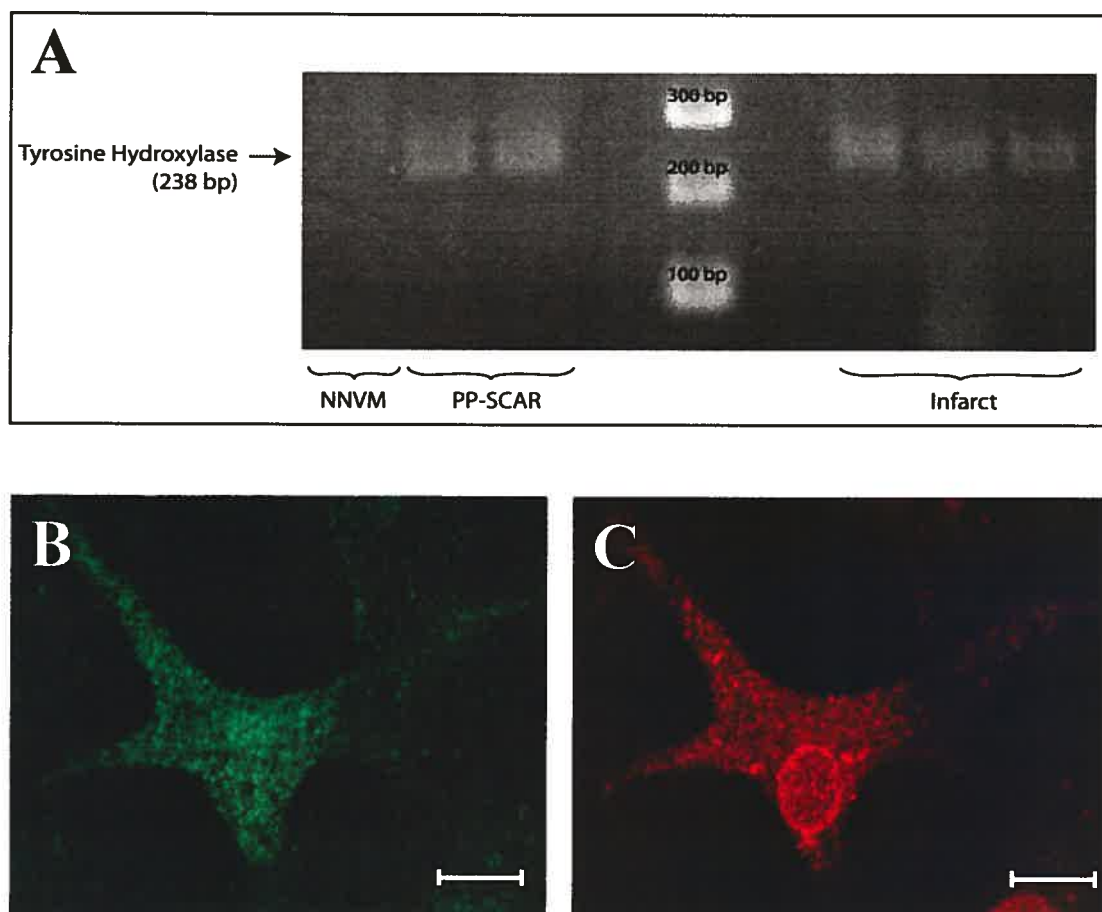


Figure 3.12 : Expression de la tyrosine hydroxylase dans les cellules neuronales au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine. A PCR fait sur des myocytes néonataux (NNVM), de cellules cicatricielles d'une semaine en culture de premier passage (PP-SCAR) et de tissus cicatriciels totaux (Infarct). Expression de la peripherin **B** et de la tyrosine hydroxylase **C** dans les neurones possiblement sympathiques. (63X) Échelle : 10µm

3.3 Troisième partie :
Origine des cellules neuronales : Caractérisation des
cellules souches neuronales (CSN)

La population cellulaire ectopique semble donc avoir des traits neuronaux et gliaux. Par contre, on ne sait toujours pas l'origine de ces cellules. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous quant à leur provenance : soit que ces cellules font déjà partie du tissu myocardique de manière différenciée, soit qu'elles y résident de manière non différenciée, ou soit que ces cellules ne sont pas présentes dès le départ dans le myocarde, et migrent au site de lésion suite à l'infarctus. Puisque la littérature au niveau de la cicatrice cutanée parle déjà de la présence de cellules souches qui auraient la potentialité de se différencier en cellules neuronales et gliales, on tout d'abord voulu vérifier leur présence au niveau de la cicatrice cardiaque.

Figure 3.13 : Expression de la protéine spécifique aux cellules souches neuronales Nestin.

Tous les types cellulaires de la lignée neuronale sont retrouvés au niveau de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus d'une semaine (neurones, astrocytes, oligodendrocytes). L'origine de ces cellules au sein de la cicatrice est encore inconnue, mais une de nos hypothèses est que ces cellules proviendraient de la différenciation de cellules souches neuronales (CSN). Ces cellules ont comme marqueur spécifique la protéine nestin, une protéine qui forme un des filaments intermédiaires des cellules non-différenciées. Cette protéine est effectivement exprimée par nos cellules d'aspect neuronal en culture (*in vitro*) et *in vivo*. Les figures 3.13 A et B présentent deux CSN en culture qui expriment avec une très forte intensité la protéine nestin. On peut également retrouver ces cellules dans le cœur entier (observé par immunofluorescence et contraste de phase à 10X) en très grand nombre

dans la zone péri-IM, ainsi que dans la zone IM, et en nombre moins important dans la zone non-infarctée (NILV; non-infarcted left ventricle), entre les myocytes (voir figure 3.13C-D). Le cœur normal ne contient peu ou pas de cellules exprimant nestin (figure 3.13E-F). Une cellule marquée positivement à nestin identifiée in vivo à fort grossissement (63X) peut également être observée (figure 3.13G).

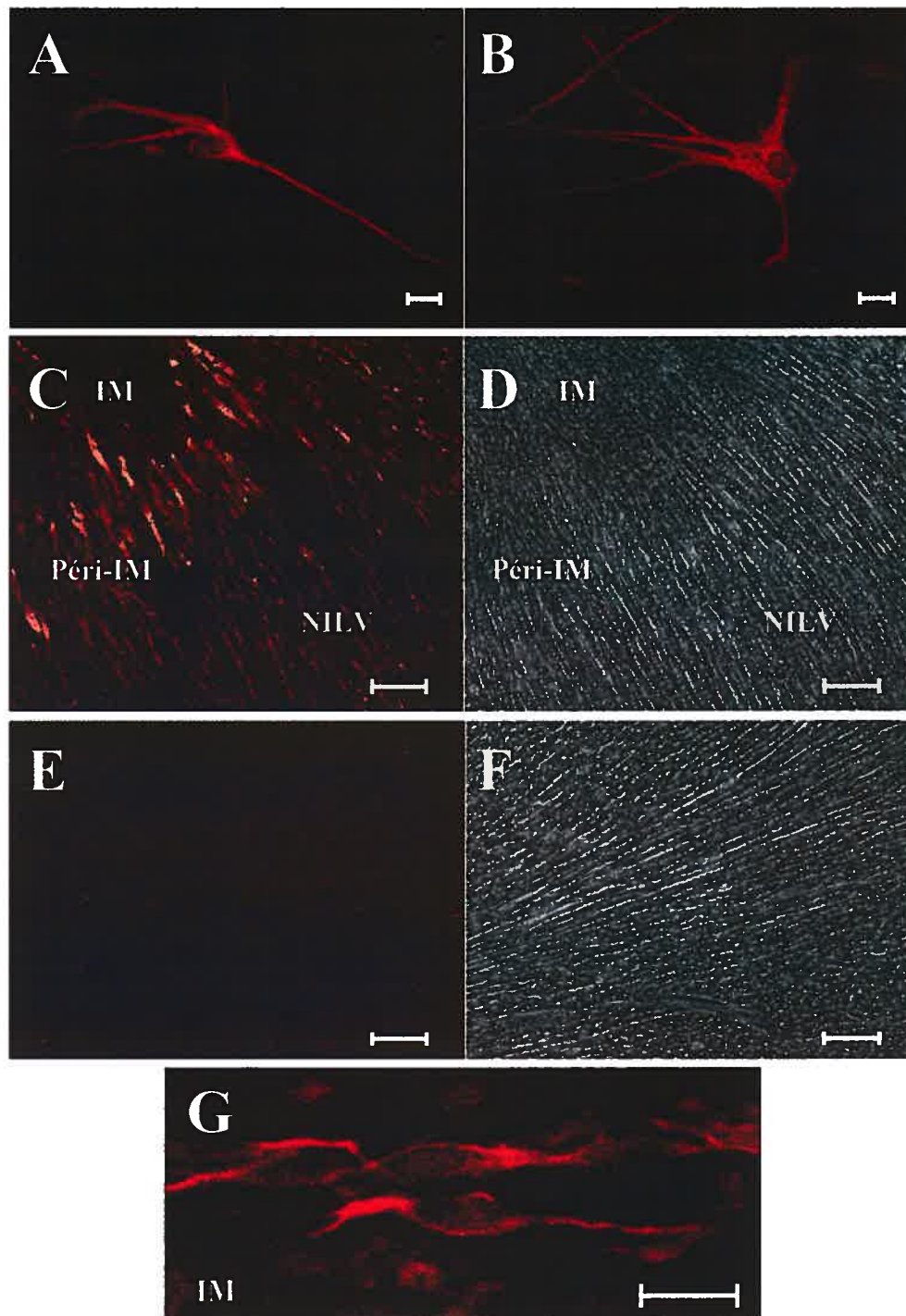


Figure 3.13 : Expression de la protéine spécifique aux cellules souches neuronales Nestin. Culture cellulaire (*in vitro*) démontrant deux cellules d'aspect neuronal exprimant la protéine nestin qui est propre aux CSN (A-B). Photos prises par immunofluorescence (C-E) et contraste de phase (D-F) à 10X de coupes de 14 μm de cœur infarcté d'une semaine (C-D) et de cœur normal (E-F) : présence de cellules marquées à nestin dans la zone IM, péri-IM et entre les myocytes (NILV) à 10X (C) et à 63X (G) et absence de ces cellules au niveau du cœur normal (E). Échelle : C-F = 100μm; A-B et G = 10μm

Figure 3.14 : Astrocytes réactifs.

Les astrocytes réactifs proviennent de la différenciation des cellules souches neuronales (CSN) suite à l'exposition à des stimuli précis, libérés par exemple, suite à une blessure. Ces cellules possèdent des caractéristiques des astrocytes matures, en plus d'avoir conservé quelques propriétés des CSN. En effet, les astrocytes réactifs exprimeront les filaments intermédiaires nestin et vimentin, en plus d'exprimer GFAP de manière simultanée, protéine qui est normalement retrouvée dans les astrocytes matures.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Un marquage de nestin colocalisé avec GFAP (figure 3.14A et B respectivement) a été obtenu, de même que la colocalisation de vimentin avec GFAP (figure 3.14C et D), ce qui permet de conclure en la présence d'astrocytes réactifs au sein de la cicatrice cardiaque.

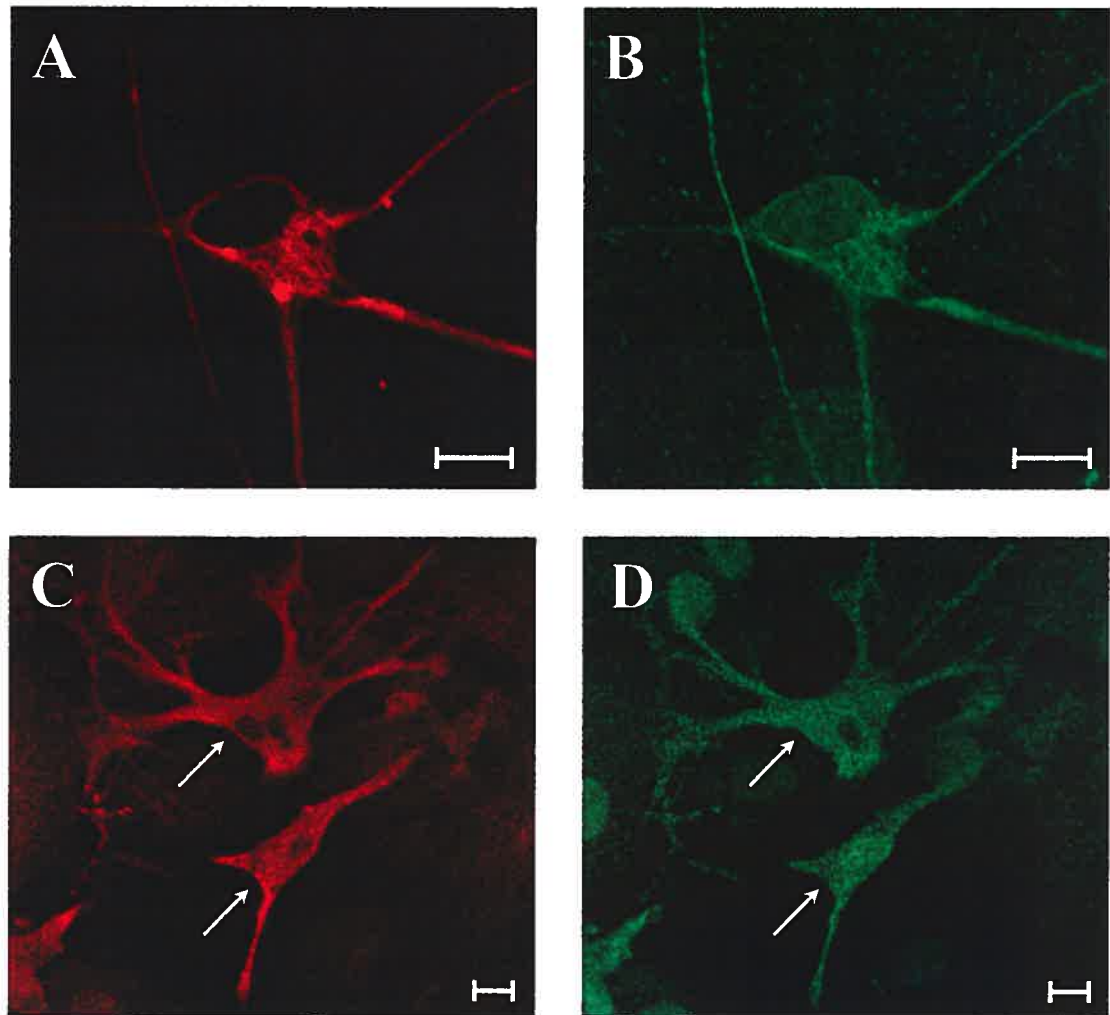


Figure 3.14 : Astrocytes réactifs. Co-expression de nestin **A** et de glial-fibrillary acidic protein (GFAP) **B**. Co-expression de vimentin **C** et de GFAP **D**. (63X)
Échelle : 10µm

Figure 3.15 : Neurones à différents stades de différenciation.

Au cours du développement des neurones, l'expression de nestin est peu à peu remplacée par celle de filaments intermédiaires matures, comme par exemple neurofilament-M (NF-M). Il est possible d'observer ce phénomène de transition de l'expression de ces filaments suite à la maturation cellulaire dans notre culture cicatricielle. La figure 3.15 montre la présence de neurones à différents stades de différenciation : l'intensité de l'expression de nestin est inversement proportionnelle à celle de NF-M. Plus la cellule est mature, moins elle exprime nestin, et plus elle exprime NF-M (figure 3.15A et B). Un stade intermédiaire peut également être observé dans les figures 3.15C et D.

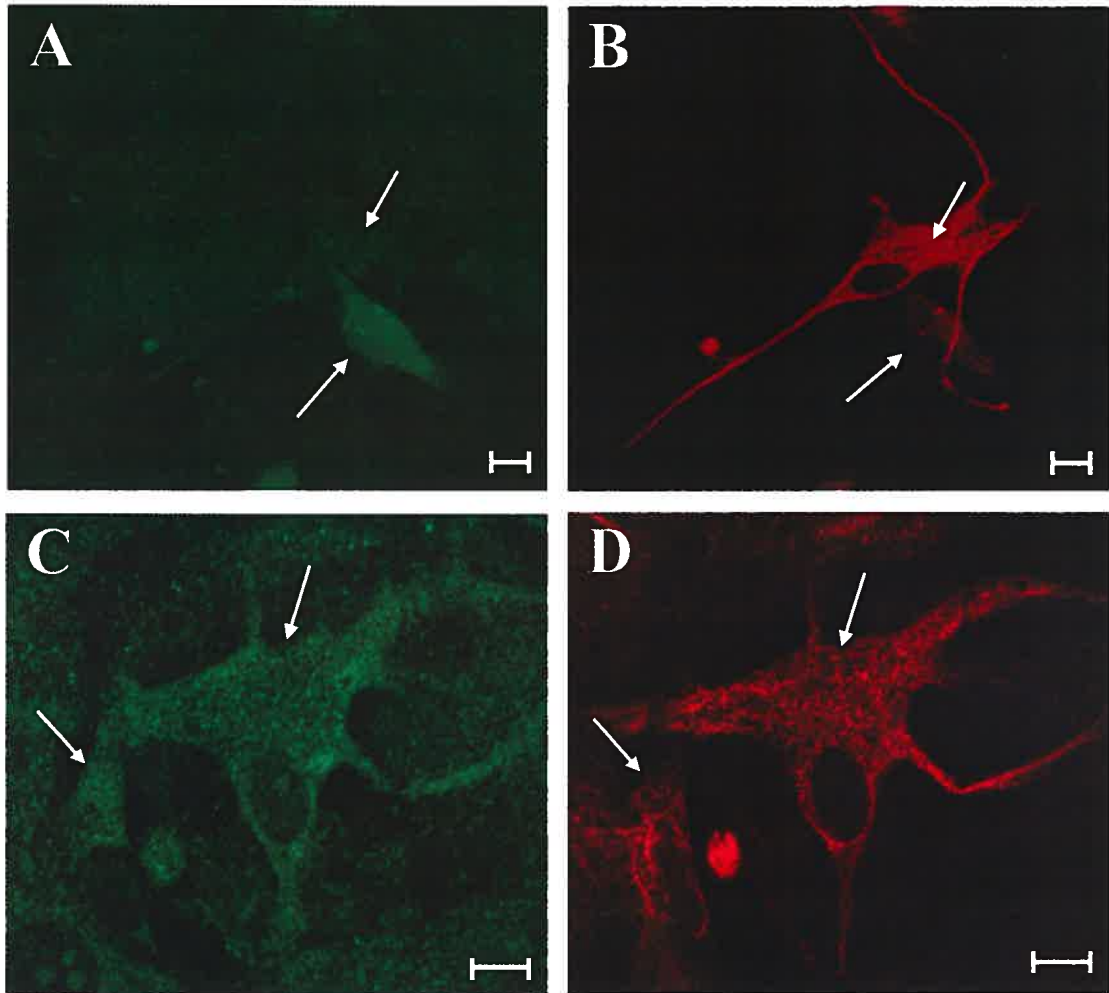


Figure 3.15 : Neurones à différents stades de différenciation. Quatre cellules identifiées avec un patron d'expression différent de neurofilament-M (NF-M; 145 kDa) **A-C** et de nestin **B-D**. Plus la cellule est différenciée, plus son expression de NF-M est intense, mais moins celle de nestin l'est. (63X) Échelle : 10 μ m

Chapitre 4

Discussion

Il est bien connu que suite à un infarctus du myocarde, la zone infarctée acquerra de nouvelles propriétés bien différentes de celles du reste du myocarde. En effet, en réponse à l'occlusion d'une artère coronaire, prendra place le processus de cicatrisation afin d'éviter une éventuelle rupture ventriculaire. Cette réponse physiologique essentielle est définie comme étant de la fibrose réparative. Les principales cellules impliquées dans cette fibrose réparative sont les myofibroblastes, caractérisés par l'expression de la protéine SMA.

La cicatrice cardiaque et cutanée possède plusieurs points en communs. Tout d'abord, dans les deux cas, le processus de cicatrisation est initié par une inflammation aigüe, accompagnée d'une libération importante de cytokines et de médiateurs chimiques de toute sorte. D'autre part, dans les deux types de cicatrice, le principal type cellulaire retrouvé est le myofibroblaste. On verra également une angiogénèse importante dans les deux cas afin de maintenir le tissu viable. Par contre, cette angiogénèse au niveau du cœur semble demeurer insatisfaisante pour combler la demande en oxygène du myocarde. Ce faisant, la zone infarctée au niveau du cœur restera hypoxique.

Une autre différence majeure retrouvée entre les deux types cicatriciels réside au niveau de la permanence de ces dernières. En effet, au niveau de la peau, une fois que le tissu est réparé, aseptisé et remplacé par du tissu d'origine, la cicatrice faite de déchets, de structures transitoires et de myofibroblastes tombe sans laisser de trace. Par contre, ceci n'est pas le cas au niveau du cœur. La cicatrice résidera de manière

permanente au sein du tissu myocardique sain, entraînant plusieurs conséquences à long terme sur la conductivité et la contractilité myocardique.

Plusieurs études ont suggérées l'implication des nerfs sensitifs dans l'amélioration de la guérison cicatricielle au niveau cutané, en plus de la synthèse du facteur neurotrophique NGF par les myofibroblastes invasifs facilitant ce processus^{9, 12, 87, 111-112, 116-117}. De plus, une étude récente a identifié un type de cellules souches multipotentes dans le derme de la peau qui aurait la capacité de se différencier en cellules neuronales et qui pourraient avoir des implications dans la cicatrisation cutanée suite à une blessure.¹³⁵ Il a de plus été démontré que des cellules souches localisées dans le SNC pouvaient migrer au site d'une blessure avant de s'y différencier en types neuronaux, afin de participer à ce processus de guérison tissulaire, et ce, tant au niveau du SNC lui-même qu'au niveau de la peau ou des muscles.^{124-128, 134-131} Tout ceci suggère que le recrutement de cellules souches neuronales en réponse à une blessure représente un phénomène physiologique conservé, indépendamment du site de la blessure.

Puisque la région cicatricielle du cœur suivant un infarctus du myocarde démontre une capacité de recrutement des cellules souches (conditions similaires à celles retrouvées au niveau de la cicatrice cutanée), ceci nous a poussé à examiner la possibilité de leur recrutement, ainsi que de leur différenciation en types neuronaux afin de participer à la guérison cicatricielle au niveau du coeur, ainsi qu'à d'élucider le rôle potentiel des myofibroblastes dans ce phénomène, via la synthèse de NGF.

Cette discussion sera divisé en trois parties : une première partie servant à la caractérisation de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde, une seconde servant à la caractérisation d'une population ectopique de cellules au niveau de la zone infarctée, et enfin une troisième section caractérisant l'origine possible de cette population cellulaire.

4.1 Première partie : **Caractérisation d'une culture de cellules cicatricielles** **d'une semaine post-infarctus.**

Suite à l'occlusion de l'artère coronaire descendante gauche d'un cœur de rat, la perte de tissu ventriculaire fonctionnel causée par l'infarctus est associée à une diminution de la pression systolique ventriculaire gauche, de la vitesse de contraction (+dP/dt) et de relaxation (-dP/dt) (résultats non présentés). Une fois les analyses hémodynamiques faites, la zone infarctée de cœur a été enlevée et mise en culture suite à une série de digestions (voir méthodologie). Trois à cinq jours suivant la mise en culture initiale, l'analyse des populations cellulaires a été effectuée. Deux populations cellulaires distinctes ont été observées (Figure 3.1) : une population de cellules avec des corps cellulaires d'aspect plus rond et lumineux comprenant un ou plusieurs prolongements membranaires (ayant la morphologie de neurones), parsemée parmi les myofibroblastes. Les marquages positifs des myofibroblastes à la SMA et la vimentin (Figure 3.2) confirme que les cellules mises en culture sont bien des cellules cicatricielles, tel que rapporté dans la littérature.^{9, 143} Après 6-9 jours en culture, il a été possible d'observer des contacts entre les prolongements membranaires de la population ectopique d'aspect neuronal (Figure 3.1B, flèche). Après 14 jours de culture, le nombre total de cellules d'aspect neuronal (évalué de manière qualitatif) a clairement augmenté, puis une agrégation cellulaire formant une crête est devenue visible (figure 3.1C). Cette population cellulaire ectopique a également été observée dans la cicatrice cardiaque de rats, trois semaines après l'infarctus, ainsi que chez la souris (résultats non-présentés).

Les sceptiques pourraient penser que les cellules mises en culture ne proviennent pas uniquement de la zone cicatricielle d'un cœur post-IM, mais qu'elles pourraient contenir une certaine contamination par du tissu sain entourant la cicatrice. Puisque la zone infarctée du ventricule gauche, suite à un infarctus d'une semaine est facilement discernable du tissu non-infarcté grâce à sa couleur (due à l'ischémie), et que nous disséquons une partie supplémentaire de tissu autour de la cicatrice excisée, nous croyons que le tissu récolté et mis en culture représente exclusivement du tissu cicatriciel. D'autre part, nous avons déjà déterminé dans des études antérieures que la taille de l'IM était en corrélation avec la fonction cardiaque.¹⁷⁵ Les résultats obtenus dans cette section au niveau des photographies prises en contraste de phase et en immunofluorescence sont donc cohérents avec nos attentes quant à la présence des myofibroblastes. On peut donc affirmer que la population cellulaire ectopique réside au sein de la cicatrice cardiaque d'une semaine.

4.2 Deuxième partie : **Caractérisation de la population cellulaire ectopique (neurones, astrocytes et oligodendrocytes) au sein d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-infarctus.**

La seconde partie du travail consistait à caractériser pour finalement identifier cette population cellulaire d'aspect neuronal. Puisque des études faites sur la cicatrice cutanée avaient démontré la grande production de NGF par les myofibroblastes,¹² et que cette neurotrophine est, entre autre, impliquée dans le développement des neurones, mais également dans la différenciation des cellules souches neuronales en neurones,¹⁴⁰ on a vérifié si sa présence était également détectée dans la cicatrice cardiaque. On a réussi à démontrer par immunofluorescence qu'il y avait non seulement présence de NGF et de ses récepteurs TrkA et p75 dans nos cellules d'aspect neuronal (figure 3.3C, 3.4B et D), mais également dans nos myofibroblastes (figure 3.3A et B, 3.4A et C), malgré la variabilité de leur patron d'expression. En effet, le NGF se retrouvait parfois sur les filaments d'actine, mais d'autre fois, le patron était plutôt diffus au niveau du cytoplasme. Ceci peut être expliqué par le fait que l'actine, présente au niveau des myofibroblastes, peut être retrouvée sous une forme dissociée ou sous une forme de fibres de stress, tout dépendant de l'état dans lequel la cellule se trouve et, de l'environnement. L'analyse par immunobuvardage des cellules cicatricielles passagées a révélé plusieurs bandes immunoréactives pour le NGF, soit à ~27 et ~19 kDa, qui représentent des formes de NGF immature (prépro- et pro-NGF) à divers degrés de transformation (figure 3.3E). Ces mêmes bandes ont également été détectées dans une culture de cellules provenant du tissu ventriculaire

de la zone non-infarctée du cœur, mais à un degré d'expression moindre (plus faible intensité des bandes). D'une manière surprenante, il a également été possible de voir l'expression de NGF au niveau des fibroblastes ventriculaires de cœur normal, mais son expression était très variable selon les expériences, et de plus faible intensité.

Une autre neurotrophine produite par nos populations cellulaires cicatricielles a été identifiée : BDNF est exprimé dans les deux populations, mais d'une manière plus importante au niveau des cellules d'aspect neuronal (figure 3.3D). Une étude plus approfondie concernant ce facteur neurotrophique devra être poursuivie afin de vérifier la présence de ses récepteurs, son activité, sa sécrétion et son rôle au niveau de la cicatrice cardiaque.

La présence de NGF biologiquement actif dans le surnageant de nos cultures de cellules cicatricielles a également été validée par ELISA (figure 3.5) et une augmentation temporelle dans la sécrétion de ce facteur a également été observée, ce qui peut être dû en partie à l'augmentation du nombre de cellules en culture, mais également à l'effet autocrine et paracrine de ce facteur neurotrophique qui stimule sa propre production.¹⁰ Il serait intéressant de vérifier cette sécrétion peptidique *in vivo*, tant sur la cicatrice que sur les zones non infarctées du cœur, à différents temps de sacrifice après un IM. Ces résultats seraient probablement plus représentatifs de la réalité, et éviterait l'utilisation de résultats biaisés par la culture cellulaire.

Quant aux résultats obtenus par immunofluorescence concernant le NGF et ses récepteurs, il nous semblait surprenant d'obtenir des marquages si intenses au niveau des noyaux. En effet, la littérature connue concernant les récepteurs capables de se transloquer au niveau nucléaire semblait se limiter aux récepteurs des hormones sexuelles (estrogène, testostérone, etc.). Par contre, une étude récente a démontré qu'il existerait une translocation du complexe NGF-récepteur au niveau du noyau afin d'aller agir directement sur la transcription génique.⁴¹ De plus, plusieurs autres récepteurs à activité tyrosine kinase se transloquant au noyaux suite à leur activation ont été identifiés au cours des dernières années, tels que les récepteurs au FGF et au EGF.¹⁴⁴⁻¹⁴⁵ Suite à ces observations, le marquage obtenu concernant le NGF et ses récepteurs ne peut plus être considéré comme un simple artefact ou comme un marquage non-spécifique de l'anticorps, mais plutôt comme un événement physiologique normal. Plusieurs manipulations nous restent par contre à effectuer afin d'avoir une meilleure compréhension de ce phénomène de translocation. En effet, l'anticorps utilisé lors de nos expériences reconnaissait la totalité des récepteurs, i.e. les récepteurs membranaires non conjugués au peptide ainsi que ceux complexés au NGF, internalisés ou non. Une courbe de temps observant la liaison et l'internalisation de la protéine serait intéressant à observer (via l'utilisation de deux anticorps : un reconnaissant la totalité des récepteurs et un second reconnaissant uniquement les récepteurs phosphorylés liés au NGF). De plus, une étude préliminaire (n=2) démontrant à dans un intervalle de 24h la translocation de TrkA vers la région périnucléaire/nucléaire suite à une stimulation avec 1µg/ml de NGF 2.5S a été effectuée sur des fibroblastes isolés du ventricule gauche de cœur normal (résultats

non démontrés). Cette étude devra être approfondi afin d'obtenir des images à des temps plus rapprochés afin d'avoir une meilleur idée de la dynamique de translocation.

L'activité neurotrophique du milieu cicatriciel a ensuite été vérifiée à l'aide de cellules de phéochromocytome (PC12). En effet, il est très bien établi par la littérature que l'exposition de ces cellules à un facteur neurotrophique stimule leur différenciation en un phénotype neuronal.⁷⁷ L'exposition de ces cellules non différenciés (figure 3.6A) au surnageant de la culture de cellules cicatricielles d'une semaine post-IM de passage primaire pendant une période de 5 jours a effectivement induit leur différenciation en cellules pourvus de multiples prolongements neuronaux (figure 3.6B). Un contrôle a été effectué pour vérifier si le milieu de culture utilisé (FBS 7%) contenait les facteurs stimulants la différenciation des cellules PC12, mais aucun prolongement membranaire n'a été observé (résultats non-démontrés). Ceci nous démontre que les facteurs entraînant la différenciation cellulaire en un phénotype neuronal proviennent des cellules cicatricielles, et non du milieu de culture. Par contre, on connaît la composition du surnageant en ce qui a trait au NGF (concentration déterminée par ELISA), on sait qu'il y a probablement du BDNF de libéré par les cellules (démontré par immunofluorescence, mais à des concentrations non déterminées), mais on ne sait pas si il y a d'autres facteurs présents dans le surnageant cellulaire qui pourraient participer à cette différenciation. Ces résultats nous permettent donc de dire qu'il y a effectivement des facteurs sécrétés par les cellules cicatricielles, comprenant le NGF et le BDNF, que ces facteurs participent à la différenciation des cellules PC12, qu'ils pourraient être impliqués dans la survie et

la différenciation des cellules neuronales²⁴ au niveau de la cicatrice cardiaque, en plus de jouer un rôle direct dans la formation de la cicatrice via l'induction du phénotype myofibroblastique, ainsi qu'un rôle secondaire en stimulant l'angiogénèse^{83, 87, 170}. Cependant, on ne peut pas dire à ce stade de l'étude qu'il s'agit des seuls facteurs impliqués dans ce phénomène. Une manière pour déterminer si d'autres facteurs sont impliqués dans cette différenciation cellulaire est d'utiliser une technique de « blocking peptide », i.e. de neutraliser tout le NGF et le BDNF présent dans le milieu à l'aide d'anticorps et de stimuler les PC12 avec ce nouveau milieu. Des dosages par ELISA devront être effectués préalablement afin de s'assurer que la totalité du NGF et du BDNF ait été neutralisé. Ensuite, dans le cas où il resterait des facteurs actifs impliqués dans la différenciation cellulaire, une analyse complète du surnageant devra être effectuée afin de mieux comprendre l'environnement cicatriciel au niveau du cœur.

Conséquemment à ces résultats, on a regardé l'expression et l'organisation de NF-M (figure 3.6) dans les cellules PC12 exposées au surnageant pour la même période de temps. Conformément aux résultats déjà démontrés dans la littérature^{176, 178}, on peut voir une expression de NF-M en condition basale (figure 3.6D), ainsi qu'une organisation des filaments au niveau des prolongements membranaires suite à la différenciation cellulaire causé par le surnageant (figure 3.6E). Une comparaison de l'intensité de l'expression de la protéine entre les cellules basales et différenciées avec le milieu cellulaire serait intéressante à faire, puisque la régulation de l'expression de la protéine est dépendante du stade de différenciation cellulaire.^{176, 178}

Puisque l'environnement cicatriciel semble être propice au développement des cellules neuronales, nous avons vérifié quelques marqueurs spécifiques aux neurones dans les cellules en culture. Il est bien de préciser à ce stade que la classification cellulaire en fonction de marqueurs protéiques n'est pas définitive et absolue. Plusieurs types cellulaires peuvent exprimer la même protéine, mais ce qui fait qu'elle est spécifique et caractéristique à un type cellulaire en particulier dépend de plusieurs autres critères. Par exemple, on retrouve l'expression de la NF-M dans les neurones¹⁴⁷, mais également dans les cellules PC12 non différenciées.¹⁷⁷ Par contre, une différence majeure existe au niveau morphologique : les neurones ont une morphologie très caractéristique de leur classe, avec de longs prolongements membranaires (axone et dendrites), tandis que les cellules PC12 ont une morphologie beaucoup plus simple, ronde, sans prolongement membranaire lorsque non différenciées. D'autre part, le groupe de Leinwand et al. ont démontré que les myofibroblastes exprimaient, dans certaines conditions, les chaînes lourdes de la myosine sarcomérique et squelettique (sarcomeric and skeletal myosin heavy chain), mais n'était par contre pas défini comme étant des cellules musculaires cardiaques ou squelettiques.¹⁷³ De plus, une étude récente a démontré que des myofibroblastes hépatiques isolés d'un foie cirrhotique co-exprimeraient la SMA, la GFAP, la molécule d'adhésion des cellules neuronales (neural-cell adhesion molecule), la synaptophysin et plusieurs facteurs neurotrophiques.¹⁷⁴ Dans cette étude, l'auteur ne définit pas les myofibroblastes comme étant des cellules neuronales ou astrocytiques, puisque ces cellules s'y distinguent par leur morphologie. Ceci dit, les critères principaux sur lesquels notre étude a été basée ont été en premier lieu la morphologie

cellulaire (forme et taille), ainsi que l'expression de certaines protéines les plus représentatives de la classe cellulaire regardée. Cette caractérisation n'est pas définitive et absolue, c'est-à-dire qu'afin de valider une identité cellulaire, plusieurs marqueurs devront être regardés, et souvent co-exprimés, en plus de déterminer la fonction précise qu'exerce le type cellulaire en question. Ceci est le début de l'étude, et beaucoup reste encore à faire.

Les premières protéines observées étaient la neurofilament-M (NF-M) et la peripherin, qui forment des filaments intermédiaires retrouvés dans les neurones matures seulement. Un marquage positif a été obtenu dans les cellules d'aspect neuronal (figures 3.7A et B, 3.8A). De manière surprenante, nous avons également obtenu un marquage positif dans les myofibroblastes, avec une organisation variable des filaments (figures 3.7C, 3.8B). L'hypothèse de la non-spécificité de nos anticorps fut éliminée grâce à la reprise de l'expérience sur des fibroblastes NIH 3T3. En effet, aucun signal ne fut détecté dans ces fibroblastes (figures 3.7D et 3.8C). Les mécanismes impliqués dans l'expression de ces protéines neuronales dans les myofibroblastes restent par contre à déterminer. Il serait tentant de penser que l'expression de ces protéines pourrait dépendre en partie de l'environnement pathologique présent au niveau du cœur suite à un infarctus (quantité importante de facteurs inflammatoires et neurotrophiques libérés), et que cette dite expression représenterait un phénotype secondaire à leur identité.

Une autre protéine neuronale a été identifiée dans les cellules cicatricielles, qui est habituellement impliquée dans la croissance des cônes axonaux des neurones en

développement : la gap-43. Le patron d'expression des neurones s'est avéré variable en ce qui a trait au noyau (certaines avaient un noyau très fortement marqué, d'autre pas), mais sa distribution cytoplasmique (granuleux diffus) est restée constante (figure 3.9A et B). Un signal négligeable a été observé au niveau des myofibroblastes.

Les différences morphologiques observées en contraste de phase entre les différentes cellules ectopiques (variabilité dans le nombre et la longueur des neurites) nous a poussé à vérifier s'il y avait aussi présence de cellules de la lignée gliale, soient des astrocytes et des oligodendrocytes/cellules de Schwann. On a obtenu un signal positif pour la GFAP (protéine exprimée par les astrocytes; figure 3.10) et la MOSP (protéine exprimée par les oligodendrocytes/cellules de Schwann; figure 3.11) dans un bon nombre de cellule de la population d'aspect neuronal. La GFAP a une fois de plus été exprimée par les myofibroblastes selon des patrons d'expression variables (marquage nucléaire et cytoplasmique suivant ou non les filaments d'actine), mais toujours aucun marquage n'a été détecté au niveau des fibroblastes NIH 3T3, suggérant encore une conséquence de l'environnement sur les myofibroblastes.

Afin de mieux comprendre la présence de ces cellules, il nous fallait comprendre à quel genre de neurones nous avions à faire. On a tout d'abord regardé si ces cellules contenaient la machinerie nécessaire à la synthèse de neurotransmetteurs adrénérgiques. On a trouvé un marquage positif à l'enzyme tyrosine hydroxylase dans des cellules de la cicatrice cardiaque exprimant la peripherin (figure 3.12B-C) *in vitro*, en plus d'avoir été détectée par PCR (figure 3.12A PP-SCAR *in vitro* et Infarct *in vivo*). Par contre, aucune détection n'a été obtenue dans les myocytes néonataux, qui

consistait notre contrôle négatif. La tyrosine hydroxylase participe à la synthèse des catécholamines dans les neurones sympathiques matures. Donc, en plus de fournir un indice supplémentaire sur l'identité de ces cellules, l'expression de cette protéine suggère un rôle potentiellement sympathique de ces neurones au sein de la cicatrice.¹²

Une limitation rencontrée au travail effectué consiste en la spécificité des anticorps utilisés. Il est facile de se demander si le marquage plutôt inattendu obtenu dans des myofibroblastes est vraiment spécifique ou s'il ne dépend pas plutôt de la non-spécificité des anticorps. Plusieurs contrôles ont été effectués : spécificité des anticorps secondaires, contrôle positif de chaque anticorps vérifié sur une culture de neurones et d'astrocytes mésencéphaliques et contrôle négatif des mêmes anticorps sur les fibroblastes NIH 3T3. On a également testé plusieurs modifications au protocole d'immunofluorescence en fonction des différents protocoles retrouvés dans la littérature afin de voir si les variations dans les techniques de fixation ou d'incubation pouvaient affecter le marquage. Tous ces contrôles se sont avérés justes. D'autre part, des résultats préliminaires d'immunobuvardage sur chaque protéine regardé dans cette section ont été obtenus, confirmant les marquages obtenus par immunofluorescence.

Les divers marquages effectués par immunofluorescence nous ont donc démontré la présence, non pas d'une seule population cellulaire ectopique dans la cicatrice cardiaque, mais bien d'une nouvelle variété cellulaire. En effet, des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes/cellules de Schwann sembleraient être présents et

pourraient être impliqués dans la cicatrisation. Les divers résultats obtenus nous suggèrent que le microenvironnement cicatriciel rencontré au niveau du cœur suite à un infarctus du myocarde serait favorable à la présence et au développement de ces types cellulaires, mais dans quel but? Même si leur présence a été identifiée, l'origine précise de ces cellules reste encore inconnu. La partie qui suit donne une hypothèse sur l'origine potentielle de ces cellules.

4.3 Troisième partie :

Origine des cellules neuronales : caractérisation des cellules souches neuronales (CSN) au sein de la cicatrice cardiaque.

L'hypothèse directrice concernant l'origine des cellules neuronales reposait sur l'implication des cellules souches. Notre travail consistait à démontrer la présence de ce type cellulaire par des marqueurs spécifiques. Puisque la réserve adulte de cellules neuronales provient des cellules souches neuronales (CSN), c'est ce type de cellules souches qui fut recherché. Le marqueur connu *in vivo* des CSN est la nestin, une protéine qui forme un type de filaments intermédiaires dans ces cellules, qui est également exprimée dans les neurones et cellules gliales en développement, mais qui est remplacée peu à peu par d'autres protéines spécifiques à chaque lignée neuronale lors de la maturation.¹⁸⁴ La figure 3.13A et B présente deux cellules neuronales en développement exprimant la protéine nestin *in vitro*, confirmant notre hypothèse sur la présence de CSN. Cette protéine est exprimée uniquement dans la population cellulaire ectopique. Aucun marquage n'a été détecté dans les myofibroblastes. Des résultats préliminaires obtenus sur des cryocoupes tissulaires de cœurs avec un infarctus d'une semaine ont également démontré la présence de ces cellules en périphérie et dans l'infarctus (figure 3.13C-G). On peut également observer la présence de ces cellules entre les myocytes dans le tissu sain du ventricule gauche. En condition normal, ce sont les fibroblastes qui résident entre les fibres myocardiques, alors il serait tentant de penser que 1- les fibroblastes, en condition pathologique, se différencient en un stade plus précoce, pluripotent, pour se redifférencier en cellules

neuronales, ou que 2- le tissu myocardique contient un réservoir de cellules souches neuronales dispersé entre les myocytes.

De plus, il a été démontré dans la littérature, à plusieurs reprises, que suite à une blessure au niveau de la colonne vertébrale, les cellules épendymaires retrouvées dans les ventricules cérébraux se différencient en astrocytes réactifs¹¹⁰, exprimant à la fois la nestin (marqueur des CSN), la vimentin et la GFAP (marqueur des astrocytes matures).⁹⁹⁻¹⁰⁰ Ces cellules migrent ensuite au site de lésion de la moelle épinière pour y former une cicatrice gliale. Ces cellules épendymaires sont donc considérées comme ayant la potentialité des cellules souches neuronales.¹²⁵ Puisque les stimuli impliqués dans la différenciation des cellules épendymaires en astrocytes réactifs proviennent principalement du site de blessure, on a supposé que ce modèle pourrait être maintenu dans le cœur et que nous pourrions également y voir la présence d'astrocytes réactifs. On a donc vérifié leur présence au niveau de la zone infarctée du cœur. La figure 3.14 montre la colocalisation des trois marqueurs spécifiques de ces cellules (nestin, vimentin et GFAP). Dans la situation actuelle, on pourrait penser que la participation de ces cellules dans le site de lésion aurait un but similaire à celui retrouvé au niveau du SNC : la formation d'une cicatrice gliale.

On a également pu observer plusieurs stades de différenciation des CSN en neurones (figure 3.15). En effet, ces stades ont pu être observés grâce à la transition de l'expression des filaments intermédiaires spécifiques aux neurones neurofilaments-M versus l'expression de nestin. En effet, on a pu voir que plus l'expression de NF-M

augmentait, plus l'expression de nestin diminuait. Des stades intermédiaires ont également été observés (figure 3.15C et D). D'autres protéines régulées par le développement devront par contre être regardé afin de confirmer les résultats obtenus.

Plusieurs étapes restent à franchir avant de pouvoir affirmer avec une conviction absolue qu'il y a bel et bien des cellules souches au niveau du cœur qui, suite à une pathologie coronarienne comme un infarctus du myocarde, se différencieraient en cellules neuronales et gliales et participeraient à la cicatrisation. On n'a aucun doute sur la présence d'une population cellulaire ectopique au tissu sain, par contre, plusieurs autres marqueurs devront être testés avant d'affirmer sans l'ombre d'un doute leur identité. De plus, cette première caractérisation a été faite en majorité par immunofluorescence. D'autres méthodes devront être employées afin de donner plus de valeur à ces résultats. Par exemple, il serait intéressant de vérifier par PCR et immunobuvardage l'expression de ces mêmes marqueurs.

De plus, pour l'instant, on ne comprend pas vraiment leurs implications dans le phénomène de cicatrisation, et la seule chose que nous puissions faire est de spéculer sur leurs rôles potentiels. D'ailleurs, de prime abord, nous attribuerions à ces cellules un rôle principalement sécrétoire, favorisant une guérison cicatricielle plus rapide et efficace.

D'autre part, une étude préliminaire d'analyse génétique de la culture de cellules cicatricielles a été effectuée par « Affymetrix gene chip », une technique qui consiste

à détecter les gènes qui sont activement exprimés dans nos cellules. Cette étude nous offre plusieurs lignes directrices que pourrait prendre notre projet. En effet, ce « gene chip » nous a permis de voir tous les gènes actifs dans ces cellules, comprenant, entre autre, plusieurs marqueurs spécifiques à chaque lignée neuronale et gliale, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la formation des axones et des terminaisons synaptiques, de même que des récepteurs de quelques neurotransmetteurs. Quelques-uns de ces différents gènes d'intérêts ont été listés en Annexe. Ce ne sont pas des résultats très fiables compte tenu du fait que cette expérience n'a été effectué qu'une seule fois, mais ces résultats préliminaires nous suggèrent certains marqueurs qui seraient intéressants d'aller voir plus en détail.

Conclusion

En résumé, dans la présente étude, on a décrit un phénotype cellulaire basé sur l'expression de différentes protéines spécifiques. Tout d'abord, la présence d'astrocytes réactifs a été décrite par la co-expression des protéines nestin, GFAP et vimentin. En second lieu, on a démontré qu'il existait une régulation réciproque entre la nestin et la neurofilament-M/ la peripherin, supportant indirectement la présence de cellules progénitrices (CSN). De plus, la co-expression de la TH et de la peripherin a souligné un phénotype sympathique de certains neurones. En ce qui concerne les myofibroblastes, ces cellules ont tout d'abord été caractérisées comme étant les principaux médiateurs de la fibrose, indépendamment du tissu. Par contre, des études ont permis d'identifier des protéines exprimées par les myofibroblastes qui n'étaient pas considérées comme spécifiques à ces cellules. Par exemple, deux études (celle de Leinwand et al.¹⁷³ et de Cassiman et al.¹⁷⁴) ont démontré la présence de myofibroblastes exprimant des protéines spécifiques aux cardiomyocytes et aux cellules neuronales. Par contre, les auteurs ne définissent pas ces cellules comme étant des cardiomyocytes ou des cellules neuronales ou astrocytiques, puisque ces cellules s'y distinguent par leur morphologie. Leurs résultats appuient tout de même les nôtres (myofibroblastes co-exprimant la GFAP et la SMA), mais dans un contexte physiopathologique différent. Les mécanismes impliqués dans l'expression de ces protéines neuronales dans les myofibroblastes restent par contre à déterminer. Il serait tentant de penser que l'expression de ces protéines pourrait dépendre en partie de l'environnement pathologique présent au niveau du cœur suite à un infarctus, et que cette dite expression représenterait un phénomène secondaire.

Directions futures

La suite du projet consistera à renforcer la caractérisation cellulaire en cours, via PCR, immunobuvardage et autre. Le but de bien caractériser ces cellules est d'une part de mieux les connaître, et d'autre part de comprendre leurs implications au sein de la cicatrice. Il serait aussi intéressant de réussir à séparer chaque population cellulaire afin de pouvoir mieux les étudier, tant au niveau de la différenciation (en les soumettant à différentes conditions) que de la migration (à l'aide de facteurs chemoattractifs retrouvés dans la cicatrice par exemple). Cette technique pourrait être faite par exemple par gradient Ficoll, ou si des marqueurs membranaires sont identifiés pour chaque sous-population, cette isolation pourrait être faite par une technique d'anticorps couplés à des microbilles magnétiques, ou par FACS. D'autre part, l'étude de l'environnement pathologique cicatricielle devra être approfondie afin de bien comprendre toute la cascade inflammatoire impliquée lors d'un infarctus du myocarde. De plus, il serait également d'un très grand intérêt de trouver la source des cellules souches neuronales marquées à nestin présentes dans la cicatrice cardiaque. Une fois que chaque population sera bien identifiée et que leur source aura été trouvée, leurs rôles au sein de la cicatrice devront être découverts, mais d'ici là, beaucoup de travail reste à faire.

La compréhension du phénomène de cicatrisation au niveau du cœur pourrait être d'un grand secours dans le traitement des maladies coronariennes compte tenu de leur incidence actuelle. Cette compréhension donnera des avenues de traitement, tant au niveau pharmacologique que chirurgicale. De plus, une meilleure compréhension

entourant la présence des cellules souches dans le tissu cardiaque et leurs implications dans le phénomène de cicatrisation, pourrait offrir des moyens palliatifs à la chirurgie, via l'utilisation de cibles pharmacologiques plus précises.

Références

1. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of Brief ischemia : Stunning, Preconditioning, and their clinical implications (Part 1). *Circulation*. (2001) 104: 2981-2989.
2. Edwards RM, Pullen M, Nambi P. Activation of endothelin ETB receptor increases glomerular cGMP via an L-arginine-dependant pathway. *Am J physiol* (1992) 263: 1020-1025
3. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* (2002) 53: 31-47.
4. Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* (2003) 2(3): 242-256.
5. Cleutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodelling after myocardial infarction. *J. Card. Fail.* (2002) 8(6supp): S344-S348.
6. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.* (2001) 69: 513-521.
7. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* (1998) 30(9):1019-1030.
8. Gaboury L. Notes de cours de Biopathologie générale (PBC 2000) de la faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Partie D, Inflammation et réparation, par le Dr Lise Giroux, (2000-2001) pp.1-39.
9. Hasan W, Zhang R, Liu M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and α -smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res* (2000) 300: 97-109.
10. Micera A, Puxeddu I, Aloe L, Levi-Schaffer F. New insights on the involvement of Nerve Growth Factor in allergic inflammation and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* (2003) 14(5):369-74.
11. Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P, Chang H. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 α /VP16 hybrid to

- enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res* (2002) 54(3): 576-83.
12. Liu M, Warn JD, Fan Q, Smith PG. Relationship between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell tissue Res* (1999) 297: 423-433.
 13. Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signalling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* (2002) 67: 203-233.
 14. Varon S, Nomura J, Shooter EM. Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. *Biochemistry* (1968) 7: 1296-1303.
 15. Bax B, Blundell TL, Murray-Rust J, McDonald NQ. Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins. *Structure* (1997) 7(10): 1275-1285.
 16. Varon S, Shooter EM. (1970) The nerve growth factor proteins of the mouse submaxillary gland. In: Fahnstock M. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Current topics in Microbiology and immunology*, (1991) vol. 165
 17. Frasier WA, Boyld LF, Bradshaw RA. Interaction of nerve growth factor with surface membranes: biological competence of insolubilized nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1973) 70: 2931-2935.
 18. Stach RW, Shooter EM. The biological activity of cross-linked β nerve growth factor protein. *J Biol Chem* (1974) 249: 6668-6674.
 19. Frazier WA, Hogue-Angeletti RA, Sherman R, Bradshaw RA. Topography of mouse 2.5S nerve growth factor. Reactivity of tyrosine and tryptophan. *Biochemistry* (1973) 12:3281-3293.
 20. Evans BA, Richards RI. Genes for the α and γ subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO J* (1985) 4: 133-138.
 21. Stach RW, Server AC, Pignatti P-F, Piltch A, Shooter EM. Characterization of the γ subunits of the 7S nerve growth factor complex. *Biochemistry* (1976) 15: 1455-1461.
 22. Thomas KA, Silverman RE, Jeng I, Baglan NC, Bradshaw RA. Electrophoretic heterogeneity and polypeptide chain structure of the γ -subunit of the mouse submaxillary 7S nerve growth factor. *J Biol Chem* (1981) 256: 9147-9155.

23. Server AC, Shooter EM. Nerve growth factor. *Adv Protein Chem* (1977) 31: 339-409.
24. Fahnestock M. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* (1991) 165: 1-26.
25. Edwards RH, Selby MJ, Gracia PD, Rutter WJ. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J Biol Chem* (1988) 263(14): 6810-6815.
26. Isackson PJ, Bradshaw RA. The α -subunit of mouse 7S nerve growth factor is an inactive serine protease. *J Biol Chem* (1984) 259:5380-5383.
27. Moore B Jr, Mobley WC, Shooter EM. Proteolytic modification of the β -nerve growth factor protein. *Biochemistry* (1974) 13: 833-84.
28. Mobley WC, Schenker A, Shooter EM. Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor. *Biochemistry* (1976) 15: 5543-5552.
29. Nichols RA, Shooter EM. Subunit interactions of the nerve and epidermal growth factor complexes: protection of the biological subunit from proteolytic modification. *Dev Neurosci* (1985) 7: 216-229.
30. Shooter EM. Early days of the nerve growth factor proteins. *Annu Rev Neurosci* (2001) 24: 601-624.
31. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins : Roles in neuronal development and function. *Ann Rev Neurosci* (2001) 24: 677-736.
32. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* (2000) 10: 381-391.
33. Grimes ML, Beattie E, Mobley WC. A signalling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc. Natl. Acad. USA* (1997) 94: 9909-9914.
34. Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD. An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* (1997) 277: 1097-1100.
35. Tsui-Pierchala BA, Ginty DD. Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signalling complex and age-dependant regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J. Neurosci.* (1999) 19: 8207-8218.

36. Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW, Mobley WC. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induce formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* (1996) 16: 7950-7964.
37. Grimes ML, Beattie EC, Mobley WC. A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 9909-9914.
38. Yankner BA, Shooter EM. Nerve growth factor in the nucleus: interaction with receptor on the nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76(3): 1269-1273.
39. Andres RY, Jeng I, Bradshaw RA. Nerve growth factor receptors: identification of distinct classes in plasma membranes and nuclei of embryonic dorsal root neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) 74(7): 2785-2789.
40. Rohrer H, Schafer T, Korsching S, Thoenen H. Internalization of nerve growth factor by pheochromocytoma PC12 cells: absence of transfer to the nucleus. *J Neurosci* (1982) 2(6): 687-697.
41. Moughal NA, Waters C, Sambhi B, Pyne S, Pyne NJ. Nerve growth factor signalling involves interaction between the TrkA receptor and the lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and TrkA receptors in pheochromocytoma 12 cells. *Cell Signal.* (2004) 16(1): 127-136.
42. Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140Trk binding: implications for multi-subunit polypeptide receptor. *J Biol Chem* (1994) 269: 6884-6891.
43. Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and TrkA receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol. Chem* (2001) 276: 32687-32695.
44. Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT. Caveolin interacts with Trk A and p75NTR and regulates neurotrophin signaling pathways. *J. Biol. Chem.* (1999) 274: 257-263.

45. Zhou H, Summers S, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem* (1998) 273: 16 568-16 575.
46. Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* (2000) 20: 1507-1514.
47. Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* (1999) 24: 585-593.
48. Bentley CA, Lee K-F. p75 is important for axon growth and Schwann cell migration during development. *J. Neurosci.* (2000) 20: 7706-7715.
49. Aloe L, Alleva E, Böhm A, Levi-Montalcini R. Aggressive behaviour induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83: 6184-6187.
50. Cohen S. Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J Biol Chem* (1959) 234: 1129-1137.
51. Angeletti RH. Studies on the nerve growth factor (NGF) from snake venom. Molecular heterogeneity. *J Chromatogr* (1968) 37: 62-69.
52. Hogue-Angeletti RA, Frazier WA, Jacobs JW, Niall HD, Bradshaw RA. Purification, Characterization and partial amino acid sequence of nerve growth factor from cobra venom. *Biochemistry* (1976) 15: 26-34.
53. Bailey GS, Banks BEL, Pearce FL, Shipolini RA. A comparative study of nerve growth factors from snake venoms. *Comp Biochem Physiol* (1975) 51B: 429-438.
54. Chapman CA, Banks BEC, Vernon CA, Walker JM. The isolation and characterization of nerve growth factor from the prostate gland of the guinea-pig. *Eur J Biochem* (1981) 115: 347-351.
55. Rubin JS, Bradshaw RA. Isolation and partial amino acid sequence analysis of nerve growth factor from the guinea pig prostate. *J Neurosci Res* (1981) 6: 451-464.
56. Harper GP, Glanville RW, Thoenen H. The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *J Biol Chem* (1982) 257: 8541-8548.

57. Hoffman H-D, Unsicker K. The seminal vesicle of the bull: a new and very rich source of nerve growth factor. *Eur J Biochem* (1982) 128: 421-426.
58. Aloe L, Cozzari C, Levi-Montalcini R. The submaxillary salivary glands of the African rodent *Praomys (mastomys natalensis)* as the richest available source of the nerve growth factor. *Exp Cell Res* (1981) 133: 475-480.
59. Darling TLJ, Fahnestock M. The high molecular weight nerve growth factor complex from *Mastomys natalensis* differs from the murine nerve growth factor complex. *Biochemistry* (1988) 27: 6686-6692.
60. Meier R, Becker-Andre M, Gotz R, Heumann R, Shaw A, Thoenen H. Molecular cloning of bovine and chick nerve growth factor (NGF): delineation of conserve and unconserved domains and their relationship to the biological activity and antigenicity of NGF. *EMBO J* (1986) 5: 1489-1493.
61. Whitemore SR, Friedman PL, Larhammar D, Persson H, Gonzalez-Carvajal M, Holets VR. Rat beta-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. *J Neurosci Res* 20: 403-410.
62. Isackson PJ, Nisco SJ, Bradshaw RA. Expression of the α subunit of 7S nerve growth factor in the mouse submaxillary gland. *Neurochem Res* (1987) 12: 959-966.
63. Selby MJ, Edwards R, Sharp F, Rutter WJ. Mouse nerve growth factor gene: structure and expression *Mol Cell Biol* (1987) 7: 3057-3064.
64. Edwards RH, Selby MJ, Rutter WJ. Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature* (1986) 319: 784-787.
65. Murphy RA, Chlumecky V, Smillie LB, Carpenter M, Nattriss M, Anderson JK, Rhodes JA, Barker PA, Siminoski K, Campenot RB, Haskins J. Isolation and characterization of a glycosylated form of beta nerve growth factor in mouse submandibular glands. *J Biol Chem* (1989) 264: 12504-12509.
66. Reinshagen M, Geerling I, Laksmanan J, Rohm H, Lutz MP, Soinila S, Eysselein VE, Adler G. Commercial mouse and human nerve growth factors contain nerve growth factor prohormone isoforms. *J Neurosc Met* (1997) 76: 75-81.
67. Skaper SD, Pollock M, Facci L. Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophin. *Mol Brain Res* (2001) 97: 177-185.

68. Reinshagen M, Geerling I, Eysselein VE, Adler G, Huff KR, Moore GP, Lakshmanan J. Commercial recombinant human β -nerve growth factor and adult rat dorsal root ganglia contain an identical molecular species of nerve growth factor prohormone. *J Neurochem* (2000) 74: 2127-2133.
69. Yiangos Y, Facer P, Sinicropi DV, Boucher TJ, Bennett DLH, McMahon SB, Anand P. Molecular forms of NGF in human and rat neuropathic tissues: decreased NGF precursor-like immunoreactivity in human diabetic skin. *J Periph Nerv Syst* (2002) 7: 190-197.
70. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberté J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* (1996) 314: 951-960.
71. Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hruby DE, Rutter WJ. Processing and secretion of nerve growth factor: Expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Mol Cell Biol* (1988) 8(6): 2456-2464.
72. Dicou E. Nerve growth factor precursors in the rat thyroid and hippocampus. *Mol Brain Res* (1992) 14:136-138.
73. Delsite R, Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: A role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* (1999) 41: 39-48.
74. Dicou E, Lee J, Brachet P. Synthesis of nerve growth factor mRNA and precursor protein in the thyroid and parathyroid glands of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83: 7084-7088.
75. Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-Nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosc* (2001) 18: 210-220.
76. Chen Y, Dicou E, Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression in rat round spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of Sertoli cell viability. *Mol Cell Endocrin* (1997) 127: 129-136.

77. Attiah DG, Kopher RA, Desai TA. Characterization of PC12 cell proliferation and differentiation-stimulated by ECM adhesion proteins and neurotrophic factors. *J Mater Sci Mater Med* (2003) 14(11): 1005-1009.
78. Ming G, Song H, Berninger B, Inagaki N, Tessier-Lavigne M, Poo MM. Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signalling in nerve growth cone guidance. *Neuron* (1999) 23: 139-148.
79. Halliday DA, Zettler C, Rush RA, Scicchitano R, McNeil JD. Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease. *Neurochem Res* (1998) 23(6): 919-922.
80. Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Resp J* (2002) 20(2): 458-463.
81. Stanisz AM, Stanisz JA. Nerve growth factor and neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* (2000) 917:268-272.
82. Koyama T, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Abe S, Ertl R, Rennard SI. Nerve growth factor stimulates fibronectin-induced fibroblast migration (2002) 140: 329-335.
83. Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts demonstrating a direct role for this factor on tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001) 98: 6162-6167.
84. Nithya M, Suguna L, Rose C. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochem Biophys Acta*. (2003) 1620 (1-3): 25-31.
85. Matsuda H, Koyama H, Sato H, Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Matsumoto M, Konno K, Ushio H, Matsuda K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med*. (1998) 187(3): 297-306.
86. Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C, Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J* (2002) 16(10):1307-1309.

87. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* (2002) 106: 2257-2262.
88. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* (2003) 69(5): 341-374.
89. Errante LD, Wiche G, Shaw G. Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *J. Neurosci Res* (1994) 37(4): 515-528.
90. Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* (1998) 61: 1-23.
91. Portier MM, de Nechaud B, Gros F. Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev Neurosci.* (1983-84) 6(6): 335-344.
92. Lariviere RC, Nguyen MD, Ribeiro-da-Silva A, Julien JP. Reduced number of unmyelinated sensory axons in peripherin null mice. *J Neurochem* (2002) 81(3): 525-532.
93. Errante L, Tang D, Gardon M, Sekerkova G, Mugnaini E, Shaw G. The intermediate filament protein peripherin is a marker for cerebellar climbing fibres. *J Neurocytol.* (1998) 27(2): 69-84.
94. Mathew JS, Westmoreland SV, Alvarez X, Simon MA, Pauley DR, Mackey JJ, Lackner AA. Expression of peripherin in the brain of macaques (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) occurs in astrocytes rather than neurones and is associated with encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2001) 27(6): 434-443.
95. Sherwood Lauralee. *Human physiology: from cells to system*, 3rd edition, USA, Wadsworth Publishing company, 1997, 753 p.
96. Tritsch D, Cesnoy-Marchais D, Feltz A. *Physiologie du neurone*, Paris, Édition Doin, 1998, 715p.
97. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurosciences: à la découverte du cerveau*, Paris, Éditions Pradel, 1999, 654p.
98. Hunter KE, Hatten ME. Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92(6): 2061-2065.

99. Perillan PR, Li X, Simard JM. K⁺ inward rectifier currents in reactive astrocytes from adult rat brain. *Glia* (1999) 27: 213-225.
100. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* (1993) 54(1):15-36.
101. Norton WT. Do oligodendrocytes divide? *Neurochem Res* (1996) 21(4):495-503.
102. Vick RS, Neuberger TJ, DeVries GH. Role of adult oligodendrocytes in remyelination after neural injury. *J Neurotrauma*, (1992) Suppl 1: S93-103.
103. Ishii K, Toda M, Nakai Y, Asou H, Watanabe M, Nakamura M, Yato Y, Fujimura Y, Kawakami Y, Toyama Y, Uyemura K. Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury. *J Neurosci Res* (2001) 65(6):500-7.
104. Orłowski D, Soltys Z, Janeczko K. Morphological development of microglia in the postnatal rat brain. A quantitative study. *Int J Devl Neurosci*, (2003) 21: 445-450.
105. Tham CS, Lin FF, Rao TS, Yu N, Webb M. Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *Int J Devl Neurosci*, (2003) 21: 431-443.
106. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* (1996) 92: 288-293.
107. Ulvestad E, Williams K, Mork S, Antel J, Nyland H. Phenotypic differences between human monocytes/macrophages and microglial cells studied in situ and in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol*, (1994) 53(5): 492-501.
108. Chen L, Yang P, Kijlstra A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*, (2002) 10(1): 27-39.
109. Keynes R, Cook GM. Axon guidance molecules. *Cell*, (1995) 83(2):161-169.
110. Clarke DL. Neural stem cells. *Bone Marrow Transplant* (2003) Suppl 1: S13-17.
111. Kishimoto S. The regeneration of substance P-containing nerve fibers in the process of burn wound healing in the guinea pig skin. *J. Invest. Dermatol.* (1984) 83: 219-223.
112. Reynolds ML, Fitzgerald M. Long term sensory hyperinnervation following neonatal skin wounds. *J. Comp. Neurol.* (1995) 358: 487-498.

113. Basson MD, Burney RE. Defective wound healing in patients with paraplegia and quadriplegia. *Surg. Gynecol. Obstet.* (1982) 155: 9-12.
114. Carr RW, Delaney CA, Westerman RA, Roberts RG. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* (1993) 4: 467-470.
115. Engin C, Demirkan F, Ayhan S, Atabay K, Baran NK. Delayed effect of denervation on wound contraction in rat skin. *Plast. Reconstr. Surg.* (1996) 98: 1063-1067.
116. Berndt A, Kosmehl H, Katenkamp D, Tauchmann V. Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectine, laminine, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. *Pathobiology* (1994) 62: 55-58.
117. Eddy RJ, Petro JA, Tamasek JJ. Evidence for the nonmuscle nature of the "myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar. An immunofluorescence study. *Am. J. Pathol.* (1988) 131: 252-260.
118. Reynolds M, Alvares D, Middleton J, Fitzgerald M. Neonatally wounded skin induces NGF-independent sensory neurite outgrowth in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* (1997) 102: 275-283.
119. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* (1997) 37: 133-152.
120. Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P as a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. *J. Burn Care Rehabil* (1996) 17: 390-396.
121. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adulte mammalian nervous system. *Sciences* (1992) 255: 1707-1710.
122. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 2074-2077.
123. Frisen J. Stem cell plasticity? *Neuron* (2002) 35: 415-418.
124. Clarke D, Frisen J. Differentiation potential of adult stem cells. *Curr Opin Genet Dev* (2001) 11(5):575-580.

125. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in adult mammalian central nervous system. *Cell* (1999) 96: 25-34.
126. Takahashi M, Arai Y, Kurosawa H, Sueyoshi N, Shirai S. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rat. *J Neuropathol Exp Neurol* (2003) 62: 185-194.
127. Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* (1997) 9(1): 65-75.
128. Kim DH, Heo SD, Ahn MJ, Sim KB, Shin TK. Activation of embryonic intermediate filaments contributes to glial scar formation after spinal cord injury in rats. *J Vet Sci* (2003) 4(2): 109-112.
129. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* (1997) 276(5309): 71-74.
130. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1999) 284(5411): 143-147.
131. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96(19): 10711-10716.
132. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* (1999) 283(5401): 534-537.
133. Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport* (2002) 13(9): 1185-1188.
134. Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* (2003) 196: 245-250.
135. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* (2001) 3(9): 778-784.

136. Romero-Ramos M, Vourc'h P, Young HE, Lucas PA, Wu Y, Chivatakarn O, Zaman R, Dunkelman N, el-Kalay MA, Chesselet MF. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. *J Neurosci Res* (2002) 69(6): 894-907.
137. Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* (2000) 3(10): 986-991.
138. 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. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* (2001) 410(6829): 701-705.
139. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100(21): 12313-12318.
140. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* (1999) 38(1): 65-81.
141. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* (2002) 91: 1092-1102.
142. Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Gosselin H, Rouleau JL, Calderone A. AT1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol* (2003) 138(8): 1485-1494.
143. Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res* (1998) 38: 545-548.
144. Myers JM, Martins GG, Ostrowski J, Stachowiak MK. Nuclear trafficking of FGFR1: a role for the transmembrane domain. *J Cell Biochem* (2003) 88(6): 1273-1291.
145. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* (2001) 3(9): 802-808.

146. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium. *Lab Invest* (1990) 63(4): 490-501.
147. Debus E, Weber K, Osborn M. Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation*. (1983) 25(2):193-203.
148. Harris J, Moreno S, Shaw G, Mugnaini E. Unusual neurofilament composition in cerebellar unipolar brush neurons. *J Neurocytol.* (1993) 22(12):1039-59.
149. Skene JH. Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci.* (1989) 12:127-56.
150. Meiri KF, Pfenninger KH, Willard MB. Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1986) 83(10):3537-41.
151. Stathopoulos E, Naeve GS, Taylor CR, Epstein AL. LN-6: a monoclonal antibody to vimentin expressed in non-hematopoietic mesenchymal cells and derived tumors and reactive in B5-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem.* (1989) 37(9):1363-70.
152. Gabbiani G, Kapanci Y, Barazzone P, Franke WW. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol.* (1981) 104(3): 206-16.
153. Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* (1982) 51: 219-50.
154. Vogel AM, Gown AM. Monoclonal antibodies to intermediate filament proteins. Use in diagnostic surgical pathology. *Cell Muscle Motil.* (1984) 5: 379-403.
155. Osborn M, Weber K. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest.* (1983) 48(4): 372-94.
156. Leader M, Collins M, Patel J, Henry K. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology.* (1987) 11(1): 63-72.
157. Giorno R, Sciotto CG. Use of monoclonal antibodies for analyzing the distribution of the intermediate filament protein vimentin in human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* (1985) 120(3): 351-5.

158. Southwick PL, Ernst LA, Tauriello EW, Parker SR, Mujumdar RB, Mujumdar SR, Clever HA, Waggoner AS. Cyanine dye labeling reagents--carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry*. (1990) 11(3): 418-30.
159. Altmannsberger M, Weber K, Holscher A, Schauer A, Osborn M. Antibodies to intermediate filaments as diagnostic tools: human gastrointestinal carcinomas express prekeratin. *Lab Invest*. (1982) 46(5): 520-6.
160. Osborn M, Weber K. Intermediate filaments: cell-type-specific markers in differentiation and pathology. *Cell*. (1982) 31(2 Pt 1): 303-6.
161. Geisler N, Weber K. Amino acid sequence data on glial fibrillary acidic protein (GFA); implications for the subdivision of intermediate filaments into epithelial and non-epithelial members. *EMBO J*. (1983) 2(11): 2059-63.
162. Achstatter T, Moll R, Anderson A, Kuhn C, Pitz S, Schwechheimer K, Franke WW. Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cells re-examined using monoclonal antibodies, with special emphasis on the co-expression of GFP and cytokeratins in epithelial cells of human salivary gland and pleomorphic adenomas. *Differentiation*. (1986) 31(3): 206-27.
163. Kawasaki H, Kretsinger RH. Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. Protein Profile*. (1994) 1(4): 343-517.
164. Baudier J, Glasser N, Gerard D. Ions binding to S100 proteins. I. Calcium- and zinc-binding properties of bovine brain S100 alpha alpha, S100a (alpha beta), and S100b (beta beta) protein: Zn²⁺ regulates Ca²⁺ binding on S100b protein. *J Biol Chem*. (1986) 261(18): 8192-203.
165. Isobe T, Ishioka N, Okuyama T. Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. *Eur J Biochem*. (1981) 115(3): 469-74.
166. Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Akagi T, Sonobe H, Okuyama T. Immunohistochemical study on the distribution of alpha and beta subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. (1984) 45(4): 385-96.
167. Smith R. Non-covalent cross-linking of lipid bilayers by myelin basic protein: a possible role in myelin formation. *Biochim Biophys Acta*. (1977) 470(2): 170-84.

168. Lampe PD, Wei GJ, Nelsestuen GL. Stopped-flow studies of myelin basic protein association with phospholipid vesicles and subsequent vesicle aggregation. *Biochemistry*. (1983) 22(7): 1594-9.
169. Boggs JM, Rangaraj G, Koshy KM, Mueller JP. Adhesion of acidic lipid vesicles by 21.5 kDa (recombinant) and 18.5 kDa isoforms of myelin basic protein. *Biochim Biophys Acta*. (2000) 1463(1): 81-87.
170. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*. (2000) 127: 4531-4540.
171. Dyer CA, Hickey WF, Geisert EE Jr. Myelin/oligodendrocyte-specific protein: a novel surface membrane protein that associates with microtubules. *J Neurosci Res* (1991) 28(4): 607-613.
172. Dyer CA, Kendler A, Philibotte T, Gardiner P, Cruz J, Levy HL. Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol* (1996) 55(7): 795-814.
173. Rice NA, Leinwand LA. Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts. *J Cell Biol*. (2003) 163(1): 119-29.
174. Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol*. (2002) 36(2): 200-209.
175. Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Gosselin H, Rouleau JL, Calderone A. AT1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol*. (2003) 138(8): 1485-1494.
176. Helfand BT, Mendez MG, Pugh J, Delsert C, Goldman RD. A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells. *Mol Biol Cell*. (2003) 14(12): 5069-5081.
177. Aletta JM, Shelanski ML, Greene LA. Phosphorylation of the peripherin 58-kDa neuronal intermediate filament protein. Regulation by nerve growth factor and other agents. *J Biol Chem*. (1989) 264(8):4619-4627.

178. Lee VM. Neurofilament protein abnormalities in PC12 cells: comparison with neurofilament proteins of normal cultured rat sympathetic neurons. *J Neurosci.* (1985) 5(11):3039-3046.
179. Morshead CM, van der Kooy D. Disguising adult neural stem cells. *Curr Opin Neurobiol.* (2004) 14(1):125-131.
180. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells and may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* (2002) 8: 268-273
181. Kim M, Morshead CM. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. *J Neurosci* (2003) 23(33): 10703-10709.
182. Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D. *In vivo* clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cells proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* (1998) 125: 2251-2261.
183. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* (1994) 13: 1071-1082.
184. Yoshida N, Hishiyama S, Yamaguchi M, Hashiguchi M, Miyamoto Y, Kaminogawa S, Hisatsune T. Decrease in expression of alpha 5 beta 1 integrin during neuronal differentiation of cortical progenitor cells. *Exp Cell Res.* (2003) 287(2):262-271.

Annexe

Analyse d'un Affymetrix Gene Chip effectué sur des cellules cicatricielles de coeur en culture : quelques gènes les plus fortement exprimés

Le Gene chip a été effectué sur l'ARN total provenant d'une culture de cellules cicatricielles d'une semaine de passage primaire, suite à une période de culture de 20 jours.

<u>Gènes spécifiques aux oligodendrocytes</u>
Peripheral Myelin protein 22 Myelin basic protein
<u>Gènes codant pour des récepteurs impliqués dans la différenciation des astrocytes</u>
Notch 3 Ciliary neurotrophic factor Glia maturation factor- γ
<u>Gènes spécifiques aux neurones</u>
Neurogenic differentiation-1 Neuronal regeneration related protein Homer neuronal immediate early gene-1, & -3 Internexin- α (intermediate filament; neuronal progenitor cells)
<u>Gènes codants pour des protéines localisées au niveau des terminaisons synaptiques</u>
Syntaxin-4, -5a, -6, -8, -12 Synaptotagmin-11 Synaptogyrin-2 Synaptobrevin-like 1, Synaptobrevin-2 (VAMP-2) Synaptosomal-associated protein-23 (SNAP23), -29 (SNAP29)
<u>Gènes codants pour des protéines impliquées dans la formation des axones</u>
Growth-associated protein (GAP43) Roundabout receptor-1
<u>Gènes codants pour des récepteurs de neurotransmetteurs bien connus</u>
Glutamate receptor NMDA-2C, -3B GABA B receptor-1 Serotonin receptor-2A, -3A, -7