

Université de Montréal

L'implication du Stromal Cell-derived Factor-1 α
dans le remodelage cardiaque une semaine après
un infarctus du myocarde

Par
Cindy Proulx

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue
de l'obtention du grade de Maîtrise en Physiologie

Août 2008

©, Cindy Proulx, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'implication du Stromal Cell-derived Factor-1 α
dans le remodelage cardiaque une semaine après
un infarctus du myocarde

Présenté par
Cindy Proulx

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Madhu Anand-Srivastava
Président-rapporteur

Angelino Calderone
Directeur de recherche

Ashok Srivastava
Membre du jury

Résumé

L'injection de cellules souches provenant de la moelle osseuse est reconnue pour améliorer la fonction ventriculaire ainsi que le remodelage cicatriciel après un infarctus du myocarde (IM). Le *Stromal Cell-derived factor-1 α* (SDF-1 α), une chimiokine induite par l'ischémie cardiaque, représente une grande importance en raison de son rôle dans le recrutement de cellules inflammatoires et de cellules souches de la moelle osseuse vers les sites endommagés. Quoique les recherches sur le rôle de la chimiokine SDF-1 α dans le remodelage ventriculaire se multiplient, son implication dans la phase aiguë du remodelage reste inexplorée. Le but de la présente étude est de déterminer l'effet du SDF-1 α sur la taille de la cicatrice, l'hypertrophie cardiaque ainsi que la fonction ventriculaire chez des rats et des souris une semaine après un IM. La stratégie utilisée implique l'administration de l'AMD3100 (1 mg/kg, 24 heures après l'IM, pendant 6 jours), l'antagoniste sélectif du récepteur du SDF-1 α , le CXCR4. Ce récepteur est couplé à une protéine G α i et induit la migration et la prolifération cellulaire. Chez les rats du groupe IM, l'expression de la chimiokine a été détectée surtout dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales des vaisseaux cicatriciels. Le profil d'expression de la chimiokine dans le cœur infarci indique un gradient de concentration vers la cicatrice. Une semaine après l'IM, le traitement avec l'AMD3100 a diminué la taille de la cicatrice, résultant en une amélioration de la fonction ventriculaire et une diminution de l'élévation de l'expression de l'ARNm de l'ANP dans le ventricule gauche non infarci (VGNI). Chez les souris, le traitement avec l'AMD3100 a engendré les mêmes effets, soit une diminution de la taille de la cicatrice ainsi qu'une amélioration de la fonction ventriculaire. La réduction de la taille de la région infarctée chez les souris traitées avec l'AMD3100 est associée avec une atténuation de l'infiltration des neutrophiles dans la région ischémique. Ces résultats suggèrent que le blocage pharmacologique de l'axe SDF-1 α /CXCR4

lors de la phase aiguë du remodelage ventriculaire après un IM diminue la taille de la cicatrice et améliore la fonction ventriculaire, en partie, par la diminution de la réaction inflammatoire.

Mots clés : Infarctus du myocarde, cicatrice, remodelage ventriculaire, rat, souris, SDF-1 α , hypertrophie, AMD3100.

Abstract

The injection of bone marrow stem cells in the infarcted heart was shown to improve ventricular function and scar remodelling. The chemokine Stromal Cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) is implicated in the migration of inflammatory and bone marrow derived stem cells to damaged region. Despite a local increase of SDF-1 α expression in the damaged myocardium, the biological impact of the chemokine during the acute phase of remodelling in the ischemic heart remains undefined. Therefore, the present study examined the role of SDF-1 α on scar expansion, cardiac hypertrophy and ventricular function in rats following myocardial infarction (MI) via administration of AMD3100 (1 mg/kg, 24 hours post-MI and continued for 6 days) a selective antagonist of the SDF-1 α receptor, CXCR4. This receptor is coupled to a G α i protein and induced migration and proliferation of cells. In 1-week post-MI rats, chemokine expression was detected in smooth muscle and endothelial cells of blood vessels residing in the infarcted region. An SDF-1 α gradient towards the infarcted region was detected in the post-MI rat heart. In 1-week post-MI rats, AMD3100 therapy reduced scar size, concomitantly improved left ventricular function and partially suppressed the elevated expression of ANP mRNA in the non-infarcted left ventricle. Preliminary studies on mice showed that the reduced infarct size in AMD3100-treated post-MI mice was associated with an attenuation of neutrophil infiltration in the ischemic region. These data highlight the novel observation that pharmacological antagonism of the SDF-1 α /CXCR4 axis during the acute phase of reparative fibrosis post-MI attenuated scar expansion and improved ventricular function in part via attenuation of the inflammatory response.

Key words: Myocardial infarction, scar, remodelling, rat, mice, SDF-1 α , hypertrophy, AMD3100.

Table des Matières

<i>Résumé</i>	<i>iv</i>
<i>Abstract</i>	<i>vi</i>
<i>Table des Matières</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xiii</i>
<i>Liste des abréviations, sigles et acronymes</i>	<i>xiv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xx</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
1.0 <i>Les maladies cardiovasculaires</i>	<i>2</i>
1.1 <i>Les différents types cellulaires du myocarde</i>	<i>3</i>
1.1.1 Les cardiomyocytes	<i>3</i>
1.1.2 Les fibroblastes	<i>5</i>
1.1.3 Les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse	<i>5</i>
1.1.4 Les cellules souches de type neuronal	<i>6</i>
1.2 <i>L'infarctus du myocarde</i>	<i>7</i>
1.2.1 Mort cellulaire par apoptose versus mort cellulaire par nécrose ...	<i>10</i>
1.2.2 La réponse inflammatoire	<i>13</i>
1.2.3 La diminution de la fonction ventriculaire	<i>15</i>
1.2.4 Le remodelage ventriculaire	<i>16</i>
1.2.4.1 Les mécanismes compensatoires	<i>17</i>
1.2.4.2 L'hypertrophie cardiaque.....	<i>20</i>
1.2.4.3 La fibrose de réparation versus la fibrose réactionnelle	<i>22</i>
1.2.5 Les traitements	<i>25</i>
1.2.5.1 Les cellules souches.....	<i>25</i>
1.2.5.2 La thérapie cellulaire.....	<i>26</i>
1.2.5.2.1 L'injection cellulaire	<i>26</i>
1.2.5.2.2 Les limitations de la thérapie cellulaire	<i>29</i>
1.2.5.2.3 L'augmentation de la mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse	<i>29</i>
1.3 <i>Le « Stromal Cell-derived Factor-1 alpha »</i>	<i>31</i>
1.3.1 Les chimiokines	<i>31</i>
1.3.2 Le SDF-1 α	<i>34</i>
1.3.2.1 La structure du SDF-1 α	<i>35</i>

1.3.2.2 Le récepteur CXCR4.....	37
1.3.3 Les rôles de l'axe SDF-1 α /CXCR4	41
1.3.3.1 Le rôle du SDF-1 α dans l'embryogenèse.....	41
1.3.3.2 Le rôle du SDF-1 α dans l'hématopoïèse et l'inflammation	42
1.3.3.3 Le rôle du SDF-1 α dans la chimiotaxie.....	43
1.3.3.4 Le rôle du SDF-1 α dans l'apoptose.....	46
1.3.3.5 Le rôle du SDF-1 α en tant qu'inotrope négatif sur le cœur	47
1.3.3.6 Le rôle du SDF-1 α dans l'angiogenèse	47
1.3.3.7 Le rôle de l'axe SDF-1 α /CXCR4 dans l'infarctus du myocarde	48
1.3.4 L'AMD3100	49
1.3.5 L'implication de l'axe SDF-1 α /CXCR4 dans le remodelage cardiaque aigu après un infarctus du myocarde	51
1.3 Objectifs	53
<i>Matériel et Méthodes</i>	<i>55</i>
<i>2.1 Manipulations des animaux</i>	<i>56</i>
2.1.1 Ligature de l'artère coronaire et administration de l'AMD3100	56
2.1.2 Mesure de la pression ventriculaire	58
2.1.3 Sacrifices	59
<i>2.2 Utilisation des tissus</i>	<i>59</i>
2.2.1 Coupes de tissus au cryostat.....	59
2.2.2 Immunofluorescence sur les tissus pour le SDF-1 α , la nestine et l'actine α du muscle lisse.....	60
2.2.3 Coupes de tissus en paraffine	61
2.2.4 Détection de l'infiltration de leucocytes et de neutrophiles dans la région infarctée	62
2.2.5 Isolement d'ARNm et étude de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (<i>Real-Time PCR</i>)	63
<i>2.3 Étude cellulaire.....</i>	<i>67</i>
2.3.1 Culture de cardiomyocytes à partir de tissus de rats néonataux ..	67
2.3.2 Mesure de la synthèse protéique par l'incorporation de leucine tritiée ($[^3\text{H}]$ -leucine).....	68
<i>2.4 Méthodes statistiques.....</i>	<i>69</i>
<i>Article.....</i>	<i>71</i>
<i>Article 1.....</i>	<i>72</i>
<i>Résultats.....</i>	<i>109</i>
<i>4.1 Effet bénéfique «in vivo» de l'administration de 1mg/kg d'AMD3100 24 heures après l'infarctus du myocarde chez la souris.....</i>	<i>111</i>

4.2 Effets d'un traitement avec de l'AMD3100 sur l'infiltration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée chez la souris	113
<i>Discussion</i>	117
5.1 Phénotype moléculaire du cœur après un infarctus du myocarde et régulation de l'expression du SDF-1 α	121
5.2 Types cellulaires responsables de l'expression du SDF-1 alpha dans le cœur de rat adulte	124
5.3 Effet bénéfique «in vivo» de l'administration de 1mg/kg de l'AMD3100 24 heures après l'infarctus	125
5.4 Effets d'un traitement avec de l'AMD3100 sur l'infiltration leucocytaire dans la région infarctée.....	130
5.5 Effets d'un traitement avec de l'AMD3100 sur l'expression des gènes dans le cœur de rat adulte et effet biologique du SDF-1 alpha et de l'AMD3100 sur la croissance des cellules cardiaques «in vitro»	132
<i>Conclusion et perspectives futures</i>	138
<i>Références</i>	142

Liste des figures

INTRODUCTION

FIGURE 1.1 : Schéma d'une jonction GAP joignant deux cellules myocytaires.	4
FIGURE 1.2 : Illustration d'une plaque athéromateuse rompue.	8
FIGURE 1.3 : Illustration d'une région infarctée.....	9
FIGURE 1.5 : Comparaison de la nécrose et de l'apoptose.	12
FIGURE 1.6: Système rénine-angiotensine-aldostérone périphérique	19
FIGURE 1.7 : Hypertrophie concentrique versus hypertrophie excentrique .	22
FIGURE 1.8 : Fibrose réactionnelle et fibrose de réparation après un infarctus du myocarde.....	24
FIGURE 1.9 : Représentation graphique de la structure du SDF-1 α	36
FIGURE 1.10 : Mécanisme de liaison du SDF-1 α à son récepteur, le CXCR4.	36
FIGURE 1.11 : Voies de signalisation utilisées par le SDF-1 α dans le système nerveux central.....	38
FIGURE 1.12 : Représentation de la structure de l'AMD3100.....	50

ARTICLE

Figure 1. SDF-1 α mRNA expression in 1-week post-MI rats.....	95
Figure 2. SDF-1 α immunoreactivity in the infarct region.....	95
Figure 3. Molecular remodeling of the non-infarcted left ventricle (NILV) in 1-week post-MI rats and the effect of AMD31000.....	95
Figure 4. Hypertrophic modulation of SDF-1 α reactivity and mRNA expression in neonatal rat ventricular myocytes.	96

RÉSULTATS

FIGURE 4.1: Infiltration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée de souris IM non traitées..... 114

FIGURE 4.2 : Effet de l'AMD3100 sur la migration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée de souris..... 115

Liste des tableaux

INTRODUCTION

TABLEAU 1.1 : Les chimiokines et leurs récepteurs chez l'humain et la souris	33
--	----

MATÉRIEL ET MÉTHODES

TABLEAU 2.1 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR.	66
--	----

ARTICLE

Table 1 Body and heart weights of sham and 1-week post-myocardial infarct (MI) rats and the effect of AMD3100	93
---	----

Table 2 Hemodynamic parameters of sham and 1-week post-myocardial infarct (MI) rats and the effect of AMD3100	94
---	----

RÉSULTATS

TABLEAU 4.1 : Mesures du poids corporel, du poids du coeur de souris et de la taille de la cicatrice.....	112
---	-----

TABLEAU 4.2 : Mesures des pressions ventriculaires de souris	112
--	-----

TABLEAU 4.3 : Effet de l'AMD3100 sur la migration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée de souris.....	116
--	-----

Liste des abréviations, sigles et acronymes

α :	Alpha
aa :	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Akt :	Protéine kinase B
AMD3100 :	1,1'[1,4-phénylènebis (méthylène)]bis-1,4,8,11 tétraazacyclotétradécane octahydrochloride
Ang II :	Angiotensine II
ANOVA :	Analyse de variance
ANP :	Peptide natriurétique de l'oreillette
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
α-sma :	Actine α du muscle lisse
β :	Bêta
Bcl-2 :	« B-cell lymphoma »
BNP :	Peptide natriurétique du cerveau
BST-1 :	«Pre-B cell costimulating factor-1»
Ca²⁺ :	Calcium
C5a :	Complément 5a
C :	Chimiokine avec une seule cystéine en N-terminal (lymphotactine)
CC :	Chimiokines possédant deux cystéines en N-terminal
CXC :	Chimiokines dont les cystéines en N-terminal sont séparées par un acide aminé
CX₃C :	Chimiokines dont les cystéines en N-terminale sont séparées par trois acides aminés (fractalkine)
CCR :	Récepteurs pour les chimiokines de type CC
cm :	Centimètre
cm² :	Centimètre carré
CPM :	Compte par minute
CR :	Récepteur pour la chimiokine de type C (lymphotactine)

C-terminale :	Extrémité carboxy terminale
CXCL12 :	«Stromal Cell-derived Factor-1 α »
CXCR4 :	Récepteur 4 pour les chimiokines de type CXC
CXCR :	Récepteurs pour les chimiokines de type CXC
CX₃CR :	Récepteur pour la chimiokine de type CX ₃ C (fractalkine)
°C :	Degré Celsius
δ :	Delta
DABCO :	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane
DEPC :	Diéthyle pyrocarbonate
Dil :	«Cell tracker CM-Dil»
DMEM :	«Dulbecco's Modified Eagle Medium»
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate
dP/dT :	Dérivée première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (représente la vitesse de contraction)
-dP/dT :	Dérivée première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (représente la vitesse de relaxation)
DTT :	Dithiothréitol
ε :	Epsilon
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF :	Facteur de croissance épidermoïde
eNOS :	synthase du monoxyde d'azote endothéliale
ERK1/2 :	«Extracellular signal regulated kinase»
ET-1 :	Endothéline-1
ϕ :	Phi
FBS :	Sérum bovin foetal
FGF :	Facteur de croissance pour fibroblastes
γ :	Gamma
G :	Gauge
GATA4 :	«GATA binding protein 4»
G-CSF :	«Granulocyte colony stimulating factor»
GDP :	Diphosphate de guanidine

GFP :	Protéine fluorescente verte
GIT :	Isothiocyanate de guanidinium
gp120:	Glycoprotéine 120
GTP:	Guanidine triphosphate
[H³]:	Tritiée
HBSS:	«Hank's Balanced Salt Solution»
He:	Hélium
HIF-1:	«Hypoxia-inducible factor-1»
HPS:	Hématoxyline-Phloxine-Safran
ICAM-1:	«Intercellular adhesion molecule 1»
IECA:	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF-1:	Facteur de croissance pour l'insuline
IgG :	Immunoglobuline
IL-1 :	Interleukine 1
IL-6 :	Interleukine 6
IL-7 :	Interleukine 7
IL-8 :	Interleukine 8
IL-10 :	Interleukine 10
IM :	Infarctus du myocarde
INF :	Région infarctée
IP :	Intra péritonéale
ITS:	Insuline, transferrine et sélénite de sodium
JM3100 :	1,1'[1,4-phénylénébis (méthylène)]bis-1,4,8,11 tétraazacyclotétradécane octahydrochloride
KCl :	Chlorure de potassium
kDa :	Kilo Dalton
kg :	Kilogramme
KH₂PO₄ :	Phosphate de potassium
LFA-1:	«Lymphocyte function-associated antigen-1»
Lin⁻/c-kit⁺:	Lignée négative/ positive pour le récepteur de «stem cell factor»
LPS:	Lipopolysaccharides
M:	Molaire
MAP Kinases:	«Mitogen activated protein kinase»
MCP-1:	«Monocyte chemoattractant protein-1»

MEF2C:	«Monocyte enhancer binding factor 2 »
mg :	Milligramme
MMLV :	Virus du myélome aviaire
MMP :	Matrices métalloprotéinases
mg/kg :	Milligramme/kilogramme
mL :	Millilitre
mM :	Millimole
mm :	Millimètre
mm² :	Millimètre carré
μCi/mL :	Microcurie par millilitre
μm :	Micromètre
μg/mL :	Microgramme/millilitre
μg/μL :	Microgramme/microlitre
μL :	Microlitre
μM :	Micromolaire
NA :	Noradrénaline
NaCl :	Chlorure de sodium
Na₂HPO₄ :	Phosphate de sodium, dibasique, anhydre
NaOH:	Hydroxyde de sodium
NDS :	Sérum normal d'âne
Ne :	Néon
NGS :	Sérum normal de chèvre
ng :	Nanogramme
ng/mL :	Nanogramme/millilitre
Nkx2.5 :	«Homeobox protein Nkx2.5»
ηM :	Nanomole
ηm :	Nanomètre
N-terminale :	Extrémité possédant un groupement amine
OCT :	«Optimal cutting temperature»
p6:	Plaque à 6 puits
p24:	Plaques à 24 puits
p100:	Pétri de 100mm ²
p130^{cas} :	«p130 crk-associated protein»

PAM :	Pression artérielle moyenne
PBEF :	«Pre-B cell colony-enhancing factor»
PBS :	Tampon phosphate salin
PBSF :	«Pre-B cell growth stimulating factor»
PC:	Poids corporel
PdN6 :	Hexadésoxynucléotide de séquence aléatoire
PFVVG:	Pression en fin de diastole du ventricule gauche
pH :	Potentiel d'hydrogène
PKB :	Protéine kinase B
PKC:	Protéine kinase C
PI3K:	Phosphoinositide 3-kinase
PIM:	Poids de l'infarctus du myocarde
PMSF :	Phénylméthylsulfonyl fluoride
% :	Pourcentage
PSVG:	Pression systolique du ventricule gauche
Qc :	Québec
RAFTK:	«Related adhesion focal tyrosine kinase»
RFFESH:	Séquence d'acides aminés: arginine, phénylalanine (2), acide glutamique, sérine, histidine
RNASE OUT:	Inhibiteurs de RNase
RPM :	Rotation par minute
RT :	Transcriptase inverse
RT-MMLV :	Transcriptase inverse du virus des leucémies murines Maloney
Real Time-PCR :	Réaction en chaîne de la polymérase en temps réel
SCF :	«Stem cell factor»
SDF-1α :	«Stromal Cell-derived Factor-1 alpha»
SDF-1$^{-/-}$:	Animal ne possédant pas le gène de «Stromal Cell-derived Factor-1 alpha»
SERCA2 :	« Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase »
SID791 :	1,1'[1,4-phénylènebis (méthylène)]bis-1,4,8,11 tétraazacyclotétradécane octahydrochloride
SIM :	Surface de l'infarctus du myocarde
SP :	Poids du septum ventriculaire
SP/PC :	Ratio du poids du septum ventriculaire sur le poids corporel

T75:	Flacon de 75 cm ²
TCA :	Acide trichloracétique
TGF-β1 :	«Transforming growth factor-β1»
TNF-α :	Facteur de nécrose tumorale α
TUNEL:	Détection de l'apoptose par une transférase terminale et la biotine dUTP biotinylée
UTP :	Uridine triphosphate
VEGF:	«Vascular endothelial growth factor»
VG :	Ventricule gauche
VGNI:	Ventricule gauche non infarci
VG/PC :	Ratio du poids du ventricule gauche sur le poids corporel
VIH:	Virus de l'immunodéficience acquise
VLA 4 :	«Very late antigen 4»
VLA 5 :	«Very late antigen 5»
vWF:	Facteur de von Willebrand

Remerciements

Je voudrais, en tout premier lieu, remercier le Dr Angelino Calderone de m'avoir donné la chance exceptionnelle de passer quelques années dans son laboratoire. Lino, ta présence, tes idées, tes connaissances ainsi que ton désir de toujours vouloir aller au-delà des choses sont quelques-unes de tes qualités qui ont su me pousser à vouloir me dépasser dans l'accomplissement de mes études. Le soutien et les idées nouvelles que tu m'as inculqués, autant au point de vue scientifique que personnel ont fait de mon séjour à l'ICM un moment inoubliable. Merci beaucoup pour ta grande disponibilité ainsi que tes conseils précieux. Je voudrais aussi souligner que la confiance que tu m'as donnée, malgré mon titre mérité de «FGS», m'a permis de surmonter les épreuves et d'aller de l'avant. De plus, j'apprécie beaucoup tes nombreux encouragements pour le reste de ma formation. Finalement, en un mot : MERCI !!!!!

Un gros merci à mes collègues de «lab» favoris, Viviane El-Helou, Hugues Gosselin, Pauline Béguin, Robert Clément et Marc-Antoine Gillis. Mon séjour dans le laboratoire n'aurait pas été le même sans votre présence. Viviane, tes précieux conseils, ton soutien moral dans les moments difficiles, ton écoute et ton amitié ont fait de ma maîtrise un moment agréable, je dirais même «le fun en tigidou»! Merci beaucoup pour tous les services rendus ainsi que ta joie de vivre. Hugues, grâce à tes explications claires, et à ton organisation légendaire, j'ai pu comprendre les mystères profonds du RT-PCR! Merci beaucoup pour tes conseils toujours pratiques et précieux et pour ton dynamisme qui a su mettre de la vie dans le laboratoire. Et que dire de Robert! Précieux compagnon de jogging, de Dragon Boat et d'injections. Ton aide et tes conseils, autant professionnels que personnels ont été très profitables. J'espère qu'avec le nouvel agrandissement tu vas toujours pouvoir voir «ton char»!!! Marc-Antoine, sans toi, les souris seraient peut-être plus heureuses, mais nous certainement pas! Ton enthousiasme, ta joie de vivre ainsi que ton implication dans tout font de toi un homme à connaître. Ce mémoire n'aurait certainement pas été le même sans Pauline, à qui je dois de nombreuses heures de lecture. Un immense merci à toi pour ton aide précieuse et surtout, pour ton sourire, même si ce n'étais pas toujours palpitant!!! Merci à vous tous pour votre soutien et vos encouragements! Et surtout, n'oubliez pas, c'est ma «toune»!!!! Un merci tout spécial à Louis Villeneuve qui, par sa patience, son dévouement et son enseignement m'a permis de parfaire et de maîtriser la technique d'immunofluorescence. Merci beaucoup pour le temps que tu as mis dans nos projets!! J'espère pour toi que ton café restera dans ta tasse à l'avenir... Un immense merci à toutes les personnes qui travaillent ou étudient à l'Institut qui ont su faire de ma maîtrise un moment fort plaisant. Je pense particulièrement à Annick à qui je dois beaucoup de discussions sur tous les sujets possibles et impossibles ainsi qu'à Brett qui a su me montrer un point de vue différent sur plusieurs choses. Don't forget Brett, I hate you too!!! Sans oublier Marie-Claude, qui va sans doute pouvoir me succéder en tant que «FGS»! Aie, je pense que... C'est ma TOUNE!!!

Je voudrais aussi remercier le soutien financier de l'Institut de Cardiologie au cours des années 2005-2006.

Finalement, un immense merci à ma mère, Doris, mon père, Alain et mon petit frère, Carl pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études. Merci à mon amoureux Dany pour les encouragements et le soutien lors de mes présentations orales.

À mon copain, dont l'amour remplit ma vie de joie

*À mes parents et à mon frère qui m'ont toujours supportée dans
mes études et mes choix*

Introduction

1.0 Les maladies cardiovasculaires

La principale fonction du cœur est de distribuer le sang contenant l'oxygène ainsi que tous les nutriments nécessaires au bon fonctionnement des cellules dans l'organisme entier. Malheureusement, plusieurs habitudes de vie présentes dans les pays industrialisés affectent le système cardiovasculaire menant à plusieurs pathologies telles que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, les maladies valvulaires, les arythmies et l'infarctus du myocarde (IM). La cigarette, la sédentarité, les mauvaises habitudes alimentaires, l'obésité et l'hyperlipidémie représentent des facteurs de risque potentiels pour les maladies cardiovasculaires (Fondations des maladies du cœur, 2007).

En 1997, ce type de maladie se plaçait au premier rang des causes de décès avec une mortalité s'élevant à 36%. En 2001, 19 000 des 70 000 Canadiens ayant subi un IM sont décédés. En 2003, 80% de la population canadienne était à risque de développer des maladies cardiovasculaires en raison de la combinaison de plusieurs facteurs de risque. Par contre, depuis 1997, grâce aux progrès en recherche et en développement, les problèmes cardiaques sont passés au second rang des causes de mortalité, immédiatement après le cancer (Statistiques Canada, 2003). Le taux de survie des personnes hospitalisées à la suite d'un IM est donc passé de 82% à 94% (Fondations des maladies du cœur, 2007).

Suivant un IM, le cœur subit un remodelage aux niveaux cellulaire et moléculaire afin de compenser la perte de fonction. Le remodelage est constitué d'une phase aiguë et d'une phase chronique. Ainsi, le travail suivant porte plus précisément sur la phase aiguë du remodelage ventriculaire après un IM.

1.1 Les différents types cellulaires du myocarde

Le muscle cardiaque est constitué de plusieurs types cellulaires : les cardiomyocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ainsi que les cellules souches de type neuronal. Les cellules musculaires du myocarde ne constituent que 25% de la population cellulaire totale du myocarde (Jugdutt, 2003).

1.1.1 Les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont des cellules musculaires striées qui peuvent se contracter par elles-mêmes. Leur fonction principale est de produire des contractions et des relaxations simultanées qui permettent l'expulsion du sang et le remplissage ventriculaire. Les cardiomyocytes sont reliés par des jonctions intercellulaires, nommées «jonctions GAP». Ces dernières sont constituées de 6 sous-unités de protéines transmembranaires appelées connexines, qui s'agencent en un pore, nommé connexon. La liaison de deux connexons sur des membranes de cellules voisines forme une jonction GAP. Le rôle de ce type de jonction est de rapprocher deux membranes cellulaires afin de diminuer la perte d'ions et de favoriser une meilleure communication intercellulaire. Grâce à cet outillage, les cardiomyocytes peuvent se contracter de façon simultanée dans tout le ventricule (FIG. 1.1) (www.bio.espci.fr/scolarite/c_BIO/cell/cell7.htm).

Une particularité des cardiomyocytes est certainement leur incapacité de régénération. En effet, les cardiomyocytes sont considérés comme des cellules terminalement différenciées (Mima et al, 1995; MacLellan et Schneider, 2000). Cependant, plusieurs études supportent l'idée qu'une faible proportion de cardiomyocytes adultes peuvent subir un nombre limité de divisions (hyperplasie) afin de former de nouveaux cardiomyocytes à la

suite d'un dommage cardiaque (Anversa et Nadal-Ginard, 2002 ; Kajstura et al, 2004). De plus, depuis quelques années, des études démontrent qu'un petit groupe de cellules souches $\text{Lin}^-/\text{c-kit}^+$ endogènes au cœur adulte a la possibilité de se diviser et de devenir des cardiomyocytes fonctionnels (Anversa et Nadal-Ginard, 2002; Beltrami et al, 2003; Nadal-Ginard et al, 2003; Urbanek et al, 2003; Kajstura et al, 2004; Barile et al, 2007). Cependant, la proportion de cellules souches avec ce potentiel de différenciation est seulement d'une cellule sur 1000. Il a aussi été démontré par *Torella et al* (2006) que cette population cellulaire pouvait reconstruire la microcirculation cardiaque (cellules endothéliales et cellules du muscle lisse vasculaire) dans certains cas pathologiques dont l'IM. Malheureusement, les cellules souches endogènes et les cardiomyocytes pouvant se diviser ne produisent pas suffisamment de nouvelles cellules contractiles pour repeupler la région infarctée.

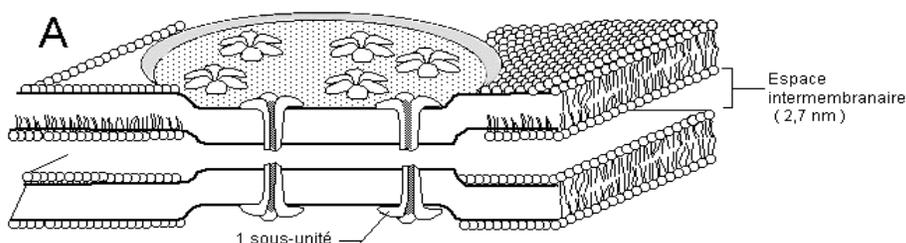


FIGURE 1.1 : Schéma d'une jonction GAP joignant deux cellules myocytaires.

La jonction GAP réduit l'espace intermembranaire entre les cellules, ce qui permet une meilleure communication intercellulaire. Elle est constituée de 2 connexons (agencement de 6 connexines) situés sur des membranes cellulaires voisines (Extrait de www.bio.espci.fr/scolarite/c_BIO/cell/cell7.htm).

1.1.2 Les fibroblastes

Quant aux fibroblastes, ils constituent 90% de la population cellulaire non myocytaire du myocarde (Jugdutt, 2003). Ces cellules produisent des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (le collagène type I, III, IV et la fibronectine) qui sont à l'origine du maintien des cellules contractiles et de l'organisation du muscle cardiaque (Eghbali, 1992). De plus, il a récemment été démontré que les cardiomyocytes pouvaient être couplés aux fibroblastes, et que ces derniers pouvaient transmettre la dépolarisation sur quelques 300 microns entre 2 cardiomyocytes afin de leur permettre une contraction simultanée (Kohl et al, 2005).

En condition pathologique, les fibroblastes se transdifférencient en myofibroblastes. Ces derniers possèdent des propriétés contractiles dues à une augmentation de l'expression de l'actine α du muscle lisse (α -sma). De plus, comparés aux fibroblastes, les myofibroblastes présentent une synthèse accrue des protéines de la MEC (Serini et Gabbiani, 1999).

1.1.3 Les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse

Comme tous les autres organes, le cœur a besoin d'être alimenté en sang. Cette fonction est possible grâce aux vaisseaux constitués de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses. Les vaisseaux sont détectés sur des coupes tissulaires par l'utilisation de marqueurs spécifiques, soit pour le muscle lisse vasculaire ou encore pour les cellules endothéliales. Habituellement, le muscle lisse est observé à l'aide d'un anticorps contre l' α -sma. Ce type d'actine est retrouvé dans les cellules musculaires lisses ainsi que dans les myofibroblastes présents dans la cicatrice (Serini et Gabbiani, 1999). Il existe plusieurs anticorps spécifiques pour les cellules endothéliales,

tels ceux reconnaissant le facteur de von Willebrand (vWF) ainsi que la synthèse du monoxyde d'azote endothéliale (eNOS) (Kuwana et al, 2006). Une nouvelle molécule a été récemment découverte dans les cellules endothéliales des vaisseaux en développement dans le cœur de souris. Il s'agit du filament intermédiaire de type VI nestine (Mokry et Nemecek, 1998 ; Mokry et al, 2004). Ce filament intermédiaire est surtout connu pour sa présence dans le cytosquelette des muscles squelettiques et des cellules nerveuses (Kachinsky et al, 1995). Il participerait aussi à la formation du cytosquelette des cellules endothéliales. Le laboratoire du Dr Calderone a démontré que dans le cœur endommagé, les cellules endothéliales des nouveaux vaisseaux expriment le filament intermédiaire VI nestine (El-Helou et al, 2005).

1.1.4 Les cellules souches de type neuronal

Finalement, des cellules souches de type neuronal ont récemment été identifiées par le groupe du *Dr Calderone* dans le cœur normal, dans la région infarctée et dans le ventricule gauche non infarcté (VGNI) (Drapeau et al, 2005 ; El-Helou et al, 2005). À ce jour, le rôle de ces cellules reste incertain. Cependant, de nouvelles approches expérimentales suggèrent que ce type cellulaire peut être un substrat pour l'angiogenèse. De plus, lorsque des cellules provenant de cicatrices de rats une semaine après l'IM sont marquées avec un agent non diffusible Dil et injectées dans un animal ayant subi un IM trois jours au préalable, il y a formation de néo vaisseaux positifs à Dil et à eNOS. Ces cellules souches de type neuronal pourraient donc être impliquées dans l'angiogenèse pendant la formation de la cicatrice.

1.2 L'infarctus du myocarde

L'IM est une maladie cardiaque fréquente dans la population vieillissante d'aujourd'hui. Il peut être précipité par la présence d'un ou de plusieurs facteurs de risque tels que la sédentarité, le tabagisme, l'éthylisme, les mauvaises habitudes alimentaires, l'obésité, l'hyperlipidémie, le diabète et l'hypertension artérielle (Fondations des maladies du cœur, 2007).

En général, l'IM est secondaire à l'athérosclérose. Cette maladie consiste en une dysfonction endothéliale créant une augmentation du stress oxydatif. Cette nouvelle condition amène une détérioration de la vasorelaxation, une prolifération des cellules musculaires lisses, une infiltration cellulaire ainsi qu'une réponse inflammatoire (De Gasparo, 2002; Dendorfer, 2005). Cette maladie engendre aussi des changements structuraux dans les vaisseaux notamment la diminution de leur lumière provoquant le blocage d'une artère coronaire. La cause la plus fréquente de mort subite par IM est la rupture d'une plaque athéromateuse conduisant à la formation d'un thrombus qui obstrue une artère coronaire privant de sang le territoire en aval (Dendorfer, 2005) (FIG. 1.2). La perte de l'apport sanguin dans le territoire de l'artère bouchée entraîne l'ischémie du muscle cardiaque. L'hypoxie ainsi produite induit la mort cellulaire (cardiomyocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) dans le territoire ischémique et altère la fonction cardiaque (FIG. 1.3). De plus, la rupture d'une plaque d'athérome provoque l'activation des plaquettes, des facteurs de la coagulation ainsi que la formation d'un caillot qui peut se loger dans la microcirculation cardiaque et provoquer un IM (Gaertner et al, 2004; Dendorfer et al, 2005).

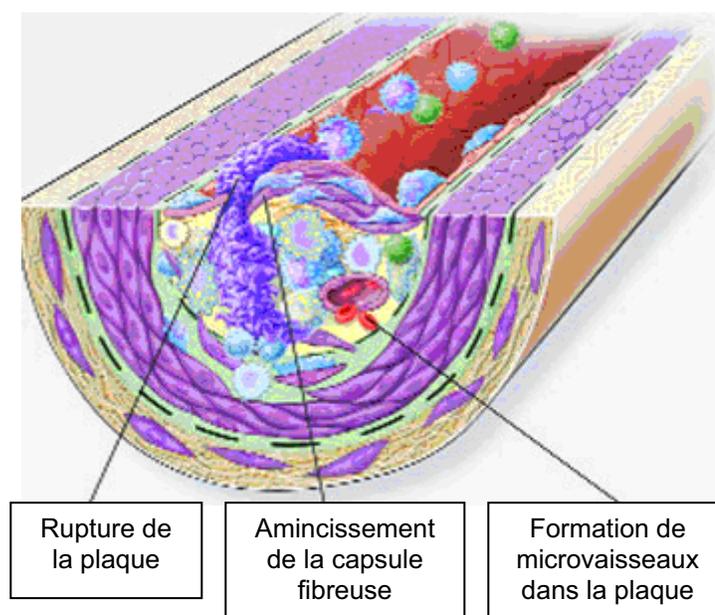


FIGURE 1.2 : Illustration d'une plaque athéromateuse rompue.

La dysfonction endothéliale causée par l'athérosclérose produit une augmentation du stress oxydatif en plus d'une détérioration de la vasorelaxation ainsi qu'une réponse inflammatoire. Dans cette image, il est possible de constater la prolifération des cellules musculaires lisses et l'infiltration cellulaire dans la plaque. Il est aussi facile d'observer la diminution de la lumière du vaisseau menant au blocage complet de l'artère coronaire. Finalement, la rupture de la plaque cause la formation d'un thrombus pouvant aller se loger dans la microcirculation (Extrait de www.medscape.com/viewarticle/502691_print).

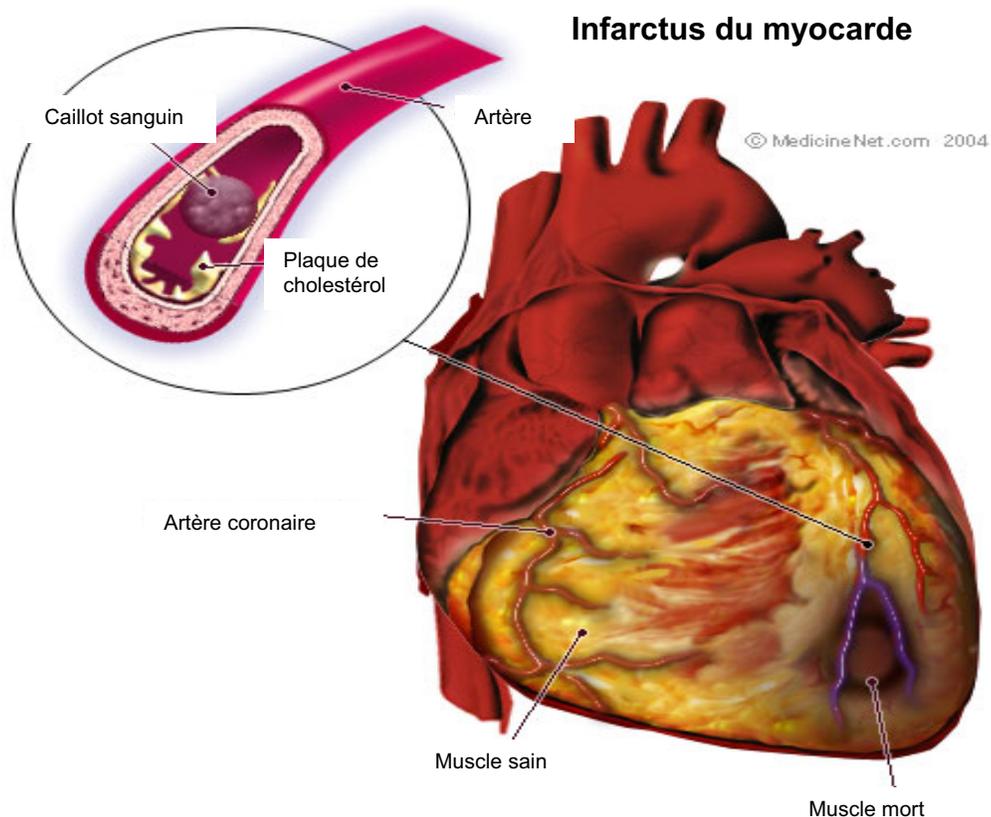


FIGURE 1.3 : Illustration d'une région infarctée.

Le blocage d'une artère coronaire par un thrombus ou par une plaque athéromateuse empêche l'apport en oxygène et en nutriments du territoire irrigué par l'artère en question. Ceci contribue à l'hypoxie qui entraîne la mort des cellules cardiaques. La fonction cardiaque est alors altérée et il y a un remodelage ventriculaire (Extrait de www.medicinenet.com).

1.2.1 Mort cellulaire par apoptose versus mort cellulaire par nécrose

Dans la zone ischémique, il y a mort cellulaire entraînant un remodelage au niveau de la paroi ventriculaire, un amincissement de celle-ci, une dilatation de la cavité ventriculaire, une activation des fibroblastes ainsi qu'une diminution de la fonction cardiaque (Anversa et al, 1998; Haunstetter et Izumo, 1998; Anversa et Kajstura, 1998; Anversa et Kajstura, 1998²). La mort cellulaire peut survenir de deux façons, par apoptose et/ou par nécrose.

La mort cellulaire programmée, ou l'apoptose, débute par une augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire et une perte du potentiel mitochondrial. Ensuite, le cytoplasme et l'ADN de la cellule se condensent diminuant ainsi le volume total de la cellule. Enfin, il y a fragmentation cellulaire et phagocytose des corps apoptotiques par les cellules voisines (Majno et Joris, 1995; Kockx et Herman, 2000; Andreka et al, 2004) (FIG. 1.5). Des études démontrent que cette cascade de réaction est activée par la famille des caspases (Nadal-Ginard et al, 2003). Dans l'IM, il y a mort de cardiomyocyte par apoptose. De plus, la mort cellulaire programmée joue un rôle dans la progression de l'IM vers l'insuffisance cardiaque (Kang et Izumo, 2000; Chen et Tu, 2002). L'apoptose est un processus indispensable au cours du développement embryonnaire normal afin de résorber certaines structures fœtales. Ce processus participe aussi à la formation du cœur, notamment des valves cardiaques (Poelmann et Gittenberger-de Groot, 2005), des vaisseaux périphériques ainsi que des vaisseaux coronariens (Fisher et al, 2000).

La mort cellulaire par nécrose est un mécanisme cytolytique où les cellules rejettent leur contenu dans l'environnement en réponse à un dommage, par exemple, une brûlure (Poelmann et Gittenberger-de Groot,

2005). La nécrose peut aussi être entamée par la libération de facteurs tels que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) dans le milieu (Frangogiannis et al, 2002). Dans ce type de mort cellulaire, la cellule gonfle jusqu'à ce qu'elle éclate (FIG. 1.5). La nécrose est accompagnée d'une inflammation locale causée par le déversement du contenu cellulaire. Ceci entraîne la production de radicaux libres, l'activation du système du complément, l'activation de la cascade des cytokines ainsi que l'augmentation des chimiokines dans l'environnement. Les chimiokines provoquent ensuite la migration de neutrophiles qui vont initier la réponse inflammatoire (Ren et al, 2003).

Lors d'un IM, les rôles joués par l'apoptose et la nécrose sont encore débattus. Une étude d'*Anversa et al* (1998) a montré que deux heures après un IM, dans la région infarctée, 2,8 millions de cardiomyocytes étaient en apoptose alors que seulement 90 000 cellules exhibaient un phénotype de nécrose. Cette même étude a démontré que l'apoptose et non la nécrose était impliquée dans la mort cellulaire au niveau du VGNI. Cependant, d'après le groupe de *Takemura et Fujiwara* (2004), les preuves sont insuffisantes pour affirmer que la plus grande partie de mort cellulaire lors d'un IM se produit par apoptose. En effet, le groupe de *Yaoita et al* (2000) prétend que la méthode de TUNEL (détection de l'apoptose par une transférase terminale et une biotine-16-dUTP) utilisée pour vérifier l'apoptose des cardiomyocytes n'est pas adéquate puisqu'elle identifie aussi la réparation d'ADN et la nécrose (Kang et Izumo, 2000). Par contre, il est démontré que lorsque des facteurs anti-apoptotiques sont administrés dans la cicatrice cardiaque, le nombre de noyaux apoptotiques diminue, suggérant un rôle de l'apoptose dans l'IM (Yaoita et al, 2000). Il est important de mentionner que les conditions essentielles au déclenchement de l'apoptose, telles que la présence de radicaux libres et de cytokines (TNF- α) sont présentes après l'induction de l'IM, ce qui favorise l'idée que l'apoptose puisse jouer un rôle dans le remodelage après un IM (Feurstein et Young,

2000). Néanmoins, il est encore, à ce jour, difficile de tirer des conclusions précises sur le type de mort cellulaire impliqué lors de l'IM (Anversa et Kajstura, 1998). Cependant, il est clair que la mort cellulaire est un phénomène d'une importance capitale dans le remodelage ventriculaire. En plus de provoquer la perte de tissu contractile, la mort des cardiomyocytes participe au déclenchement de l'hypertrophie myocytaire et de la fibrose de réparation et réactionnelle.

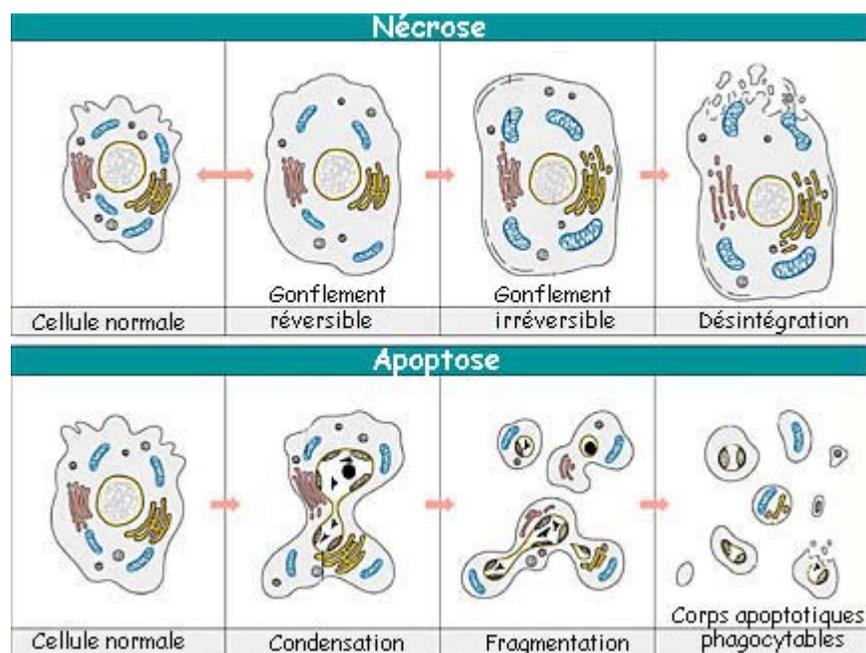


FIGURE 1.5 : Comparaison de la nécrose et de l'apoptose.

Ces images montrent les différentes étapes des deux processus de mort cellulaire. Dans la nécrose, la cellule gonfle à la suite d'un dommage (brûlure). Ce phénomène est réversible jusqu'à un certain point où il devient irréversible. C'est à ce moment que la cellule se désintègre et éclate dans le milieu, déclenchant l'inflammation locale, la production de radicaux libres, l'activation du complément et la migration de neutrophiles par les chimiokines. L'apoptose est une mort cellulaire programmée déclenchée par les caspases. Comparativement à la nécrose, elle est sans inflammation puisque le contenu intracellulaire est inclus dans des corps apoptotiques. Ces derniers sont phagocytés par les macrophages (Extrait de www.lecerveau.mcgill.ca/).

1.2.2 La réponse inflammatoire

La réaction inflammatoire est importante au cours du remodelage. Elle est essentielle à la destruction du tissu lésé ainsi qu'à sa reconstruction. Elle est initiée immédiatement après l'occlusion de l'artère coronaire et se poursuit jusqu'à la formation de la cicatrice. Environ 1 mois après l'IM, le nombre de cellules inflammatoires est grandement diminué dans la région infarctée puisqu'elles sont remplacées par des myofibroblastes (Gaertner et al, 2004).

La réponse inflammatoire débute à la suite de la mort cellulaire que provoque l'IM. En effet, il a été démontré par *Kapadia et al* (1997) que le stress causé par l'IM était un stimulus suffisant pour induire la production de cytokines telles que les interleukines 1 β et 6 (IL-1 β , l'IL-6) ainsi que le TNF- α . De plus, la mort cellulaire par nécrose stimule la formation de radicaux libres et participe à l'activation du complément. Ces deux facteurs contribuent à l'accroissement de la concentration des cytokines dans le milieu ainsi qu'à la migration de cellules inflammatoires vers la région infarctée (Frangogiannis et al, 2002; Ren et al, 2003). L'IL-1 β , l'IL-6 ainsi que le TNF- α ont la capacité de provoquer de nombreux changements structuraux dans les cardiomyocytes cardiaques. En effet, ces cytokines peuvent induire la mort cellulaire, la diminution de la contractilité myocytaire, la dégradation du tissu environnant ainsi que la formation de radicaux libres (Meldrum et al, 1998). Elles ont aussi des rôles bénéfiques, tels que l'activation des métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui dégradent la MEC et permettent la migration de cellules inflammatoires ainsi que des cellules souches. En plus, les cytokines peuvent activer la formation de collagène et promouvoir l'angiogenèse (Nian et al, 2004). Elles maintiennent aussi la fonction ventriculaire en induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes (Nakamura et al, 1998). D'autres cytokines sont produites par le myocarde infarcté, entre autres IL-8 et le complément 5a (C5a). Ces derniers jouent un rôle particulièrement important dans le

recrutement de neutrophiles au niveau de la région endommagée. L'infiltration de la région infarctée par les neutrophiles se fait très tôt après l'occlusion coronarienne (Yang et al, 2002). Les neutrophiles atteignent la zone infarctée par une interaction moléculaire complexe entre les sélectines et les intégrines présentes sur les cellules endothéliales. Ce type de cellules inflammatoires peut avoir un rôle néfaste sur les cellules viables en induisant des effets cytotoxiques par la libération d'enzymes protéolytiques ainsi qu'en liant le récepteur *Intercellular Adhesion Molecules* (ICAM-1) sur les cardiomyocytes (Lucchesi, 1994; Frangogiannis et al, 2002; Ren et al, 2003). De plus, il a été démontré que lors de la reperfusion tissulaire, le recrutement des neutrophiles vers la région endommagée entraîne aussi des effets cytotoxiques. Par contre, cette reperfusion permet l'entrée d'autres cellules inflammatoires (monocytes/macrophages) qui ont un effet plus positif sur le remodelage après un IM (Frangogiannis et al, 2002).

Principalement grâce à l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , il y a augmentation de l'expression de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) dans la région infarctée, ce qui entraîne la migration de cellules inflammatoires telles que les macrophages (Frangogiannis et al, 2002; Ren et al, 2003; Nian et al, 2004). Ces derniers arrivent en second lieu au site lésé (environ deux jours après l'occlusion coronarienne) et entreprennent le nettoyage de la région endommagée (Kakio et al, 2000). Ils exercent une influence importante sur le remodelage de la MEC. Ce type cellulaire favorise une meilleure restructuration de la MEC en débutant par sa dégradation. De plus, l'accumulation de macrophages ainsi que de mastocytes dans la région endommagée peut induire la production de facteurs de croissance qui provoquent l'angiogenèse ainsi que le recrutement et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes dans la région infarctée. Ces événements entraînent la réparation du cœur et la formation de la cicatrice (Ren et al, 2003). Une fois que la cicatrice est formée, des cytokines inhibitrices sont exprimées telles que l'IL-10. Ces dernières ont la capacité de diminuer la

réponse inflammatoire ainsi que de réguler la synthèse de MEC (Frangogiannis et al, 2002; Ren et al, 2003).

1.2.3 La diminution de la fonction ventriculaire

Après l'occlusion d'une artère coronaire, la perte de muscle cardiaque entraîne une diminution de la fonction ventriculaire. Cette dernière correspond à la capacité du cœur à pomper la quantité de sang nécessaire dans la circulation systémique. En général, la fonction ventriculaire peut être déterminée en calculant la pression artérielle moyenne (PAM) et les pressions ventriculaires à différents stades de la contraction. En effet, la PAM reflète la capacité du cœur à pomper le bon volume sanguin dans la périphérie. Une diminution de cette dernière caractérise un problème dans la contraction cardiaque. Ceci peut aussi être attesté par une diminution de la pression du ventricule gauche (PVG) lors de la systole. Cette dernière correspond à la force de contraction du ventricule gauche (VG). La pression mesurée à la fin de la diastole dans le VG (PFDVG) représente la pression juste avant la contraction cardiaque (systole). Elle tend généralement à la hausse après un IM puisque le volume résiduel en fin de systole augmente et que la cavité ventriculaire s'agrandit (Schipke et al, 1996; Poulsen, 2001). De plus, la *sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA2), une molécule impliquée dans la recapture du calcium intracellulaire vers le réticulum endoplasmique peut influencer la pression du VG en fin de diastole. Une diminution de SERCA2 est observée lors de l'IM entraînant une augmentation du calcium intracellulaire. Ceci diminue la capacité de relaxation des cardiomyocytes et augmente la PFDVG (Frank et al, 2002). La dilatation de la cavité ventriculaire qui en résulte cause un allongement des cardiomyocytes leur permettant une force de contraction maximale afin de maintenir la fraction d'éjection (volume sanguin propulsé par le cœur lors de la systole) (Gaertner et al, 2004). Ceci correspond à la mise en œuvre de la loi de

Starling : c'est un mécanisme adaptatif qui tend à maintenir le débit sanguin à des valeurs proches de la normale. Une autre mesure très utilisée en cardiologie est la dérivée première de la pression du VG en fonction du temps. Elle peut être soit positive (+dP/dT), elle représente alors la vitesse de contraction du VG ou négative (-dP/dT) représentant la vitesse de relaxation du VG. À la suite d'un IM, la +dP/dT est diminué en raison de la mort cellulaire qui fait en sorte de réduire la capacité de contraction du VG. La -dP/dT est aussi diminué après un IM puisque la capacité de relaxation des cardiomyocytes est affectée, en partie par la réduction de l'expression de SERCA2.

1.2.4 Le remodelage ventriculaire

Après un IM, le cœur doit subir une restructuration afin de maintenir ses fonctions. Le remodelage ventriculaire est un phénomène physiopathologique adaptatif essentiel à la survie qui affecte autant la région cicatricielle que la partie viable du myocarde. Il caractérise les étapes à travers lesquelles le cœur doit passer afin de restaurer sa fonction et débute dès les premières minutes suivant l'occlusion coronarienne (Blaufarb et Sonnenblick, 1996; Yang et al, 2002). Son but principal est de normaliser le stress produit sur le mur ventriculaire après un IM en plus de former une cicatrice dynamique (contenant des cellules vivantes, de la néovasculature et possédant des propriétés contractiles) dans la région infarctée, ce qui empêche la rupture du VG (Goldstein et Sabbah, 1994; Sun et Weber, 2000; Yang et al, 2002; Jugdutt, 2003; Gaertner et al, 2004). Le résultat du remodelage ventriculaire est un changement morphologique du VG (dilatation de la cavité, amincissement de la paroi ventriculaire) (Voller et Dietz, 1999).

Le remodelage ventriculaire est un processus complexe qui se divise en trois étapes (Paul, 2003). D'abord, la phase aiguë est caractérisée par la

dilatation du VG, le remplacement de la région nécrosée par une fibrose cicatricielle, l'hypertrophie compensatrice ainsi que l'instauration de mécanismes compensatoires (activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, hypertrophie et activation neurohormonale). Ensuite, la phase compensée correspond à l'action des mécanismes compensatoires qui permettent le maintien de la fonction cardiaque. Finalement, la phase décompensée représente l'insuffisance cardiaque, c'est-à-dire que les mécanismes compensatoires ne suffisent plus à maintenir la fonction cardiaque et il y a perte de cette fonction. L'atteinte de cette phase doit se produire le plus tardivement possible. C'est d'ailleurs l'objectif des thérapies actuelles. La progression à travers ces phases se fait grâce à l'interaction de plusieurs hormones et cytokines (Gaertner et al, 2004).

Les trois différentes phases du remodelage sont atteintes par de nombreux processus. La mort cellulaire et l'inflammation ont déjà été décrites dans les sections précédentes, mais il ne faut pas oublier la fibrose, l'hypertrophie ventriculaire et cellulaire et les changements aux niveaux cellulaire et moléculaire. Les prochaines sections sont dédiées aux mécanismes compensatoires, à l'hypertrophie ventriculaire et à la fibrose.

1.2.4.1 Les mécanismes compensatoires

À la suite d'un IM, la diminution de fonction ventriculaire entraîne la nécessité de mécanismes compensatoires. Les trois principaux sont la mise en œuvre de la loi de Starling, l'hypertrophie et l'activation neurohormonale (Mitu et Mitu, 1999). Ces trois phénomènes sont reliés entre eux et se complètent afin de normaliser la fonction cardiaque.

Comme mentionné précédemment, la loi de Starling correspond à l'allongement des cardiomyocytes à un point où leur force de contraction est

maximale. L'allongement des cardiomyocytes est induit par l'augmentation de la précharge ce qui cause une dilatation de la cavité ventriculaire. La précharge est augmentée par l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et la vasoconstriction. À la suite d'un IM, la dysfonction contractile amène une réduction de la fraction d'éjection du VG entraînant une diminution de la PAM. Ceci cause une diminution de pression dans l'artère rénale déclenchant l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone par la libération de rénine des cellules juxtaglomérulaires du rein (FIG. 1.6) (Voller et Dietz, 1999). Cette enzyme peut ensuite catalyser la formation d'angiotensine I. Cette dernière sera transformée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II (Ang II), un vasoconstricteur puissant qui agit principalement sur les artérioles. L'Ang II entraîne une plus grande réabsorption d'eau et de sel par les reins en plus de pouvoir stimuler la sécrétion d'aldostérone, qui va à son tour accroître la réabsorption de sodium et d'eau. Ce système neurohormonale a donc pour but d'augmenter le niveau de remplissage du système circulatoire (précharge) en vue de rétablir la pression sanguine et de produire l'allongement des cardiomyocytes pour instaurer la loi de Starling (Guyton et Hall, 2000). Un deuxième mécanisme neurohormonale, soit l'augmentation de la synthèse de l'endothéline-1 (ET-1), un vasoconstricteur puissant vient aussi augmenter la précharge ventriculaire afin de maximiser la fraction d'éjection.

Après un IM, il y a aussi production locale d'Ang II et d'aldostérone dans le cœur. L'étirement des cardiomyocytes provoque la synthèse et la sécrétion d'Ang II qui est connue pour participer à l'hypertrophie des cardiomyocytes (Booz et Baker, 1996). De plus, cette sécrétion d'Ang II permet l'activation des fibroblastes entraînant la fibrose de réparation dans la région lésée et la fibrose réactionnelle dans la région non lésée (Delcayre et Swynghedauw, 2002). En synergie avec l'Ang II, d'autres facteurs tels que l'ET-1 et l'aldostérone peuvent participer à la fibrose dans le cœur.

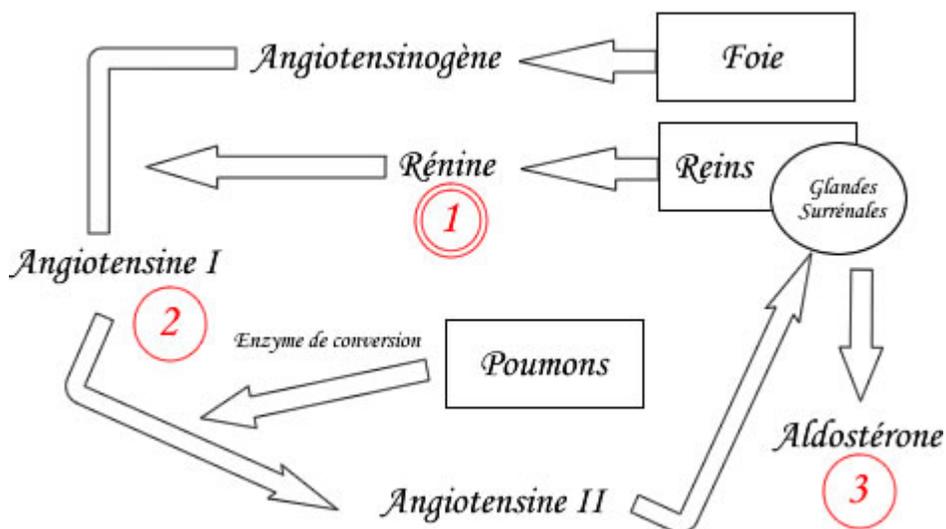


FIGURE 1.6: Système rénine-angiotensine-aldostérone périphérique

Voie d'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone dans la circulation. La rénine du rein convertit l'angiotensinogène provenant du foie en angiotensine I. L'angiotensine I est ensuite transformée en angiotensine II par l'ECA. L'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales (Extrait de <http://fr.wikipedia.org>).

D'autres mécanismes neurohormonaux sont activés à la suite d'un IM le système sympathique qui stimule la contraction et la fréquence cardiaque (inotrope et chronotrope positif) (Mitu et Mitu, 1999). Le système sympathique peut aussi participer à l'induction de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ce dernier aspect sera discuté plus en détail dans la section 1.2.4.2.

Tous ces mécanismes sont essentiels dans la phase aiguë du remodelage ventriculaire afin de permettre le rétablissement de la fonction ventriculaire. Malheureusement, à long terme, les mécanismes neurohormonaux (système rénine-angiotensine-aldostérone, ET-1, système sympathique) deviennent délétères et provoquent l'insuffisance cardiaque. Il est important de noter qu'il existe des molécules qui viennent contrecarrer

l'effet des mécanismes neurohormonaux. L'oxyde nitrique, la dopamine, les prostacyclines, la bradikinine et le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) sont des vasodilatateurs (Mitu et Mitu, 1999). De plus, l'ANP est connu pour son rôle de diurétique, ce qui vient inhiber l'effet du système rénine-angiotensine-aldostérone. Par contre, leurs effets, mêmes combinés, ne sont pas suffisamment prononcés pour neutraliser complètement l'effet délétère des mécanismes neurohormonaux. Il y a donc inexorablement une progression vers l'insuffisance cardiaque.

1.2.4.2 L'hypertrophie cardiaque

Deux types d'hypertrophie peuvent être retrouvées dans le cœur endommagé. L'hypertrophie de type excentrique est due à une surcharge volumique telle qu'observée dans un IM (Wollert et Drexler, 2002). Elle correspond à une synthèse en série des unités contractiles des cardiomyocytes (sarcomères) amenant un allongement longitudinal de la cellule. Ceci entraîne une augmentation du diamètre de la cavité ventriculaire (FIG. 1.7) (Frey et al, 2004). Quant à l'hypertrophie concentrique, elle est généralement produite par à une surcharge pressive comme dans l'hypertension artérielle. Elle correspond à une réplication en parallèle des sarcomères (FIG. 1.7) (Gerdes et Capasso, 1995).

À la suite d'un IM, l'hypertrophie excentrique a longtemps été considérée comme le seul mécanisme compensatoire. Cependant, tel que mentionné dans les sections précédentes, des cardiomyocytes ayant la possibilité de se diviser ainsi que la présence de cellules souches cardiaques sont aussi impliqués dans la compensation cardiaque après un IM (Anversa et Nadal-Ginard, 2002; Beltrami et al, 2003; Nadal-Ginard et al, 2003; Urbanek et al, 2003; Kajstura et al, 2004; Barile et al, 2007).

Lors d'un IM, l'augmentation de la PFDVG provoquée par la dilatation du VG et la diminution de SERCA2 entraînent l'étirement des cardiomyocytes et leur hypertrophie de type excentrique. L'ischémie engendrée par l'IM induit une surexpression de *Hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), ce qui active le promoteur de l'ANP dans les cardiomyocytes (Chun et al, 2003). Il a été démontré que dans l'IM, l'expression de l'ANP a un effet protecteur par ses deux actions principales : diurétique et vasodilatateur. Cette protéine vient donc inhiber l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (Awazu et al, 1989), celle du système sympathique et la synthèse d'ET-1. De plus, il a récemment été montré que l'ANP avait un rôle antifibrotique (Kasama et al, 2008). En plus de tous ces effets, il est bien connu que l'expression de l'ANP (protéine ou ARNm) est corrélée au degré d'hypertrophie ventriculaire (Lee RT et al, 1988; Dexler et al, 1989; Calderone et al, 1995). Donc, à la suite de l'ischémie, la cellule se reprogramme et il y a réexpression de gènes foetaux tels que l'ANP ainsi que la conversion à la chaîne α à la chaîne lourde β de la myosine (Gidh-Jain et al, 1998; Sugden et Clerk, 1998; Yue et al, 1998).

Le stress ventriculaire induit par l'IM active les voies de signalisation des kinases déclenchant ainsi le processus hypertrophique. Les cardiomyocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales ainsi que les cellules musculaires lisses sécrètent des peptides tels que l'Ang II et l'ET-1 qui aboutissent à l'induction de l'hypertrophie (Komuro, 2001). Le système sympathique participe aussi à l'induction de l'hypertrophie au niveau des cardiomyocytes via les récepteurs α -1 adrénergiques qui activent à leur tour une voie de signalisation impliquant une protéine $G_{\alpha q}$ (Simpson, 1983; Buxton et Brunton, 1985; Barrett et al, 1993; Ju et al, 1998). De plus, l'Ang II induit la production et la libération de noradrénaline (NA) au niveau présynaptique, diminue sa recapture et ainsi augmente l'action postsynaptique de cette catécholamine et par le fait même, l'effet du système sympathique (Ball, 1989; Saxena, 1992). D'autres facteurs peuvent aussi participer au développement de l'hypertrophie ventriculaire, tels que le *transforming growth*

factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Ruwhof et Van der Laarse, 2000) ainsi que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Seko et al, 1999). Les molécules citées précédemment permettent le déclenchement de l'hypertrophie myocytaire en plus d'avoir le potentiel de démarrer le processus d'apoptose des cardiomyocytes après un IM (Gaertner et al, 2004).

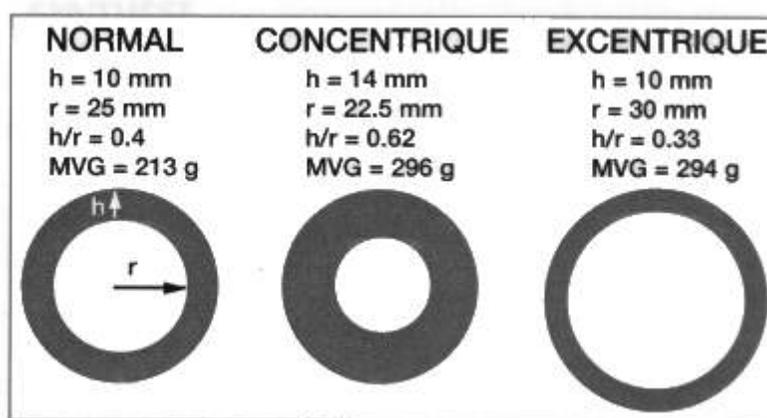


FIGURE 1.7 : Hypertrophie concentrique versus hypertrophie excentrique

Illustration d'une hypertrophie concentrique caractérisée par l'épaississement de la paroi ventriculaire versus une hypertrophie excentrique où l'augmentation de la cavité ventriculaire est prédominante. h : épaisseur de la paroi ventriculaire; r : rayon de la cavité ventriculaire; h/r : rapport de l'épaisseur de la paroi sur le rayon de la cavité ventriculaire; MVG : masse du ventricule gauche (Extrait de « les pathologies cardio-vasculaires », <http://t.vernon.free.fr>).

1.2.4.3 La fibrose de réparation versus la fibrose réactionnelle

Après une occlusion coronarienne, le tissu dans la région ischémique meurt et est remplacé par une cicatrice. La formation de la cicatrice se nomme fibrose de réparation (FIG. 1.8). La réponse inflammatoire, par la sécrétion de TGF- $\beta 1$ (Petrov et al, 2008; Narine et al, 2006), augmente le

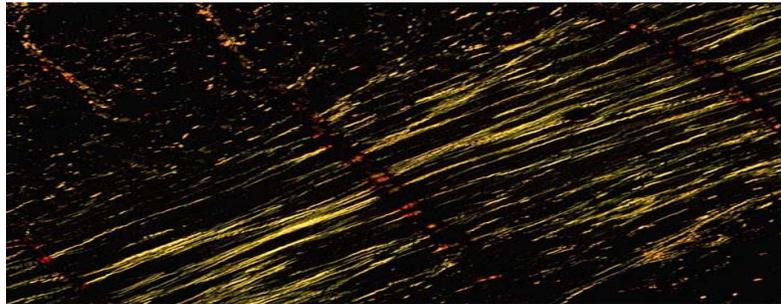
recrutement de fibroblastes et favorise leur différenciation en myofibroblastes. Les myofibroblastes sont les acteurs principaux de la fibrose. En effet, ils sécrètent une variété de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α , en plus de plusieurs facteurs de croissance (TGF- β 1, FGF (facteur de croissance pour fibroblastes)) en réponse au stress causé par l'IM (stress mécanique ainsi que l'hypoxie). Les myofibroblastes envahissent la région infarctée et participent à la production et à la sécrétion de protéines de la MEC (collagène et fibronectine majoritairement) qui formeront la cicatrice. Cette augmentation de la synthèse et de la déposition de protéines de la MEC par les myofibroblastes implique aussi l'Ang II, l'ET-1 et l'aldostérone (Booz et Baker, 1995; Dostal et al, 1996; Lijnen et Petrov, 2003).

En parallèle, dans la région non infarctée du VG (VGNI), il se produit un dépôt de protéines de la MEC qui vient entraver la contraction des cardiomyocytes fonctionnels. Ce type de fibrose est nommé réactionnel et est déclenché par les mêmes stimuli que la fibrose de réparation (FIG. 1.8). La déposition de protéines de la MEC dans le muscle cardiaque sain provoque une diminution de sa compliance et à long terme, entraîne l'insuffisance cardiaque (Swynghedauw, 1999; Creutjens et Creemers, 2002).

Normal



Fibrose Réactionnelle



Fibrose de Réparation

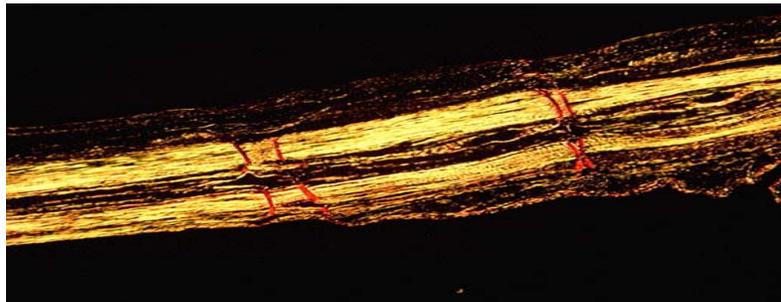


FIGURE 1.8 : Fibrose réactionnelle et fibrose de réparation après un infarctus du myocarde.

Marquage au Rouge Sirius du collagène α_1 Type 3. La fibrose de réparation est présente dans la cicatrice et correspond à un phénomène adaptatif afin d'empêcher la rupture du mur ventriculaire. Elle est donc plus dense et organisée que celle présente dans le VGNI. La fibrose réactionnelle survient en réponse aux facteurs déclenchant la fibrose de réparation et ne peut donc être évitée. Cependant, elle est néfaste et vient nuire à la contraction cardiaque à long terme (Extrait de Mercier et al, 2002).

1.2.5 Les traitements

La compréhension des phénomènes menant à la décompensation cardiaque a permis l'utilisation de médication afin de réduire le taux de mortalité après un IM. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) (empêchent la formation de l'angiotensine II) ainsi que les β -bloqueurs (bloqueurs des récepteurs β -adrénergiques) sont les médicaments les plus utilisés. Récemment, une nouvelle approche a été élaborée afin d'améliorer la fonction du cœur après un IM. Il s'agit de la thérapie cellulaire.

1.2.5.1 Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées qui possèdent deux propriétés principales. La première correspond à l'auto renouvellement illimité, c'est-à-dire qu'elles sont immortelles et qu'elles peuvent produire des cellules filles identiques sans se différencier. La seconde provient de leur capacité à produire des cellules progénitrices de transition qui ont une capacité limitée de reproduction et qui peuvent se différencier en cellules hautement spécialisées de type neuronal, musculaire, etc. Il existe plusieurs types de cellules souches. Les cellules souches totipotentes qui sont des cellules souches embryonnaires ayant le potentiel de former un organisme entier. Les cellules souches pluripotentes peuvent conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme, sans pouvoir constituer un organisme complet. Les cellules souches multipotentes sont présentes dans l'organisme adulte et sont responsables de la formation de plusieurs lignées de cellules différenciées. Finalement, les cellules souches unipotentes ne peuvent produire qu'un seul type de cellules différenciées (Majka et al, 2005).

Chez l'humain adulte, la majorité des organes possède un réservoir de cellules souches ayant la capacité de produire des cellules différenciées du tissu auquel elles sont rattachées. Le cerveau, longtemps considéré comme un organe différencié, tout comme le cœur, possède un réservoir de cellules souches. Ces cellules souches endogènes participent à la formation de nouveaux neurones à l'âge adulte (Alvarez-Buylla et Lois, 1995). Le cœur aussi contient des réservoirs de cellules souches endogènes qui peuvent restaurer les cardiomyocytes perdus lors de dommage ou encore lors du vieillissement (Beltrami et al, 2003; Torella et al, 2006). Après un IM, ces réservoirs se vident et doivent être remplacés. Une étude par *Mouquet et al* (2005) démontre que les cellules souches de la moelle osseuse migrent jusqu'au cœur infarci pour venir renflouer les réservoirs.

1.2.5.2 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire s'appuie sur l'hypothèse suivante : le remplacement du tissu endommagé par des cardiomyocytes fonctionnels peut améliorer la fonction cardiaque. Ce type de thérapie peut se faire par deux méthodes distinctes. D'une part, par l'injection de cellules exogènes ou endogènes et d'autre part, par l'augmentation de la mobilisation et de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse de l'individu.

1.2.5.2.1 L'injection cellulaire

À la suite de la découverte que l'injection de cardiomyocytes embryonnaires de rats mâles à des femelles ayant subi un IM améliore significativement la fonction ventriculaire, les recherches sur l'injection de cellules dans la région cicatricielle se sont multipliées (Scorsin et al, 1997;

Roell et al, 2002). Un des premiers types cellulaires utilisés pour la thérapie cellulaire a été les myoblastes. Le groupe de *Jain et al* (2001) a démontré que l'injection, une semaine après un IM, de myoblastes provenant de la cuisse de rats néonataux dans la région cicatricielle et péri-infarctée diminue la dilatation du VG et améliore la fonction ventriculaire après 3 et 6 semaines. Une étude semblable a été effectuée avec l'injection de cellules du muscle squelettique et les mêmes résultats ont été observés (Rajnoch et al, 2001; Piano et Carrigan, 2003; Tang, 2005). Des études similaires ont été effectuées chez l'humain. En effet, il a été démontré qu'à la suite de l'injection de myoblastes après un IM, il y a formation de myotubules dans la région cicatricielle et amélioration de la fonction ventriculaire (Laflamme et Murry, 2005; Menasché, 2007). Cependant, les myoblastes ne se différencient pas en cardiomyocytes, ce qui résulte en un mauvais couplage électrique avec les cellules environnantes et qui favorise la survenue d'épisodes d'arythmies (Smart et Riley, 2008). Malheureusement, chez l'humain, ce type cellulaire reste peu accessible, c'est pourquoi les recherches se sont tournées vers les cellules souches.

Les cellules ayant le plus de potentiel dans la thérapie cellulaire sont les cellules souches embryonnaires. En effet, elles sont les seules ayant la capacité de se différencier en cardiomyocytes et peuvent ainsi participer à l'amélioration de la contractilité du muscle cardiaque (Singla et al, 2005; Dai et al, 2007). Malheureusement, ce type de thérapie cellulaire présente de grandes limitations. Ces cellules, étant indifférenciées, ont le potentiel de se diviser indéfiniment. Alors, leur injection peut augmenter le risque d'apparition d'un tératome. De plus, le risque de rejet à la suite de l'injection est élevé (Nussbaum et al, 2007). Ces cellules sont aussi peu utilisables pour des raisons d'éthique. Ces résultats ont forcé les chercheurs à trouver d'autres types cellulaires susceptibles d'améliorer la fonction cardiaque à la suite de leur injection dans la région infarctée. Ainsi, ils se sont tournés vers les cellules souches de la moelle osseuse.

La moelle osseuse constitue l'un des principaux réservoirs de cellules souches dans le corps humain. Les cellules souches hématopoïétiques sont reconnues pour leur pouvoir de se reprogrammer dans le nouveau milieu dans lequel elles sont placées et produire des cellules spécifiques à ce nouveau tissu. De plus, il a été démontré par *Orlic et al* (2001) que l'injection de cellules souches provenant de la moelle osseuse dans des cœurs infarctés de souris pouvait reconstruire un tissu cardiaque fonctionnel dans la cicatrice. Ainsi, injectées dans le myocarde infarcté, les cellules souches de la moelle osseuse ont le potentiel de former des cardiomyocytes et de participer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Orlic et al, 2001; Hughes, 2002; Itescu et al, 2002; Lee et al, 2004; Olivares et al, 2004; Orlic, 2005; Thompson et al, 2005). Cette théorie, bien que prometteuse, a des limites. Il a été démontré que malgré que les cellules de la moelle osseuse participent à la formation de nouveaux vaisseaux dans la région infarctée, elles ne se différencient pas en nouveaux cardiomyocytes. Cependant, une amélioration significative de la fonction ventriculaire est présente. Cette amélioration peut être expliquée par un autre mécanisme comme la sécrétion, par les cellules injectées, de facteurs pouvant avoir un effet cardioprotecteur ou angiogénique (Nygren et al, 2004; Murry et al, 2004; Balsam et al, 2004; Balsam et Robbins, 2005; Leri et al, 2005). Chez l'humain, les recherches concernant l'injection de cellules souches de la moelle osseuse à la suite d'un IM sont encore à un stade préliminaire. Les résultats semblent prometteurs, mais moins importants que ce qui était attendu (Lee et al, 2004; Perin et Silva, 2004; Fazel et al, 2005; Martin-Rendon et al, 2008). Ceci peut être expliqué par le fait que la cicatrice est un endroit hostile (fibrose, inflammation et ischémie) qui peut potentiellement inactiver les cellules souches endogènes ainsi que les cellules souches injectées et minimiser les effets de cette forme de thérapie (Segers et Lee, 2008). Plusieurs autres types de cellules souches ont été testés afin de restaurer le myocarde infarcté, telles que les cellules souches hématopoïétiques (Smits et al, 2005) et

mésenchymateuses (Jaquet et al, 2005; Berry et al, 2006; Freyman et al, 2006; Yang et al, 2006).

1.2.5.2.2 Les limitations de la thérapie cellulaire

Comme il a déjà été discuté, la thérapie cellulaire en générale présente plusieurs limitations. Pour tous les types cellulaires (sauf les cellules souches de la moelle osseuse qui sont autologues), il y a toujours la possibilité de rejet, puisque les cellules injectées ne proviennent pas de l'individu, ce qui diminue leur durée de vie dans l'hôte. De plus, le succès de l'injection de cellules est toujours incertain. L'injection peut induire une mort cellulaire, ce qui fait en sorte que le nombre de cellules injectées ne correspond pas au nombre réel de cellules qui se rendent à la cicatrice.

Il est connu que les cellules souches autologues de la moelle osseuse peuvent migrer à la cicatrice, cela vient contrecarrer le problème de rejet ainsi que le problème relié à la méthode d'injection. Il s'agit alors de se doter d'un moyen pour augmenter au maximum la migration de ce type cellulaire vers la région endommagée (Schober et al, 2003).

1.2.5.2.3 L'augmentation de la mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse

Des études récentes montrent que l'administration de chimiokines, telles que le *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) ou le *stem cell factor* (SCF) augmente la migration des cellules souches de la moelle osseuse dans la circulation périphérique (Aceves et al, 2005; Kanellakis et al, 2006). Ces dernières peuvent ensuite être récoltées et injectées dans le

cœur infarcté ou bien, s'il y a présence d'un nombre suffisant de cellules souches en circulation, elles peuvent migrer vers la région ischémique et produire un effet notable.

L'effet bénéfique de la migration des cellules souches de la moelle osseuse vers le cœur infarcté est limité par la faible concentration des cellules souches circulantes ainsi que le milieu hostile créé par la zone ischémique (Segers et Lee, 2008). Le fait de mobiliser ce type cellulaire dans le sang, par des chimiokines, pourrait augmenter la migration cellulaire vers la région infarctée. Il a récemment été démontré qu'une chimiokine en particulier, le *stromal cell-derived factor 1 α* (SDF-1 α), induit le recrutement de cellules souches provenant de la moelle osseuse (Scober et al, 2003; Yamaguchi et al, 2003). Cette chimiokine est augmentée dans le cœur infarcté. En effet, *Abbott et al* (2004) ont démontré que l'augmentation du SDF-1 α dans la région entourant la cicatrice par la présence d'adénovirus augmente la migration de cellules souches vers la cicatrice. De plus, si l'effet du SDF-1 α est bloqué par un antagoniste, la migration des cellules souches de la moelle osseuse diminue significativement. Dans une autre étude, l'injection de fibroblastes surexprimant le SDF-1 α dans la cicatrice augmente le recrutement de cellules souches à cet endroit précis (Askari et al, 2003).

1.3 Le « Stromal Cell-derived Factor-1 alpha »

Le SDF-1 α est une chimiokine importante dans le recrutement des cellules souches de la moelle osseuse qui, elles, jouent un rôle essentiel dans le remodelage cicatriciel. Il est primordial de bien connaître le SDF-1 α afin de pouvoir déterminer son rôle dans le remodelage cardiaque après un IM.

1.3.1 Les chimiokines

Le SDF-1 α fait partie de la grande famille des chimiokines (environ 40 chimiokines sont caractérisées chez l'humain, voir Tableau 1.1). Elles sont de petites molécules (8 à 14 kDa) présentant des similitudes de structure avec les cytokines. Elles possèdent des capacités de chimiotaxie, d'où leur nom (CHIMIOtaxie + cytoKINE). À l'origine, les chimiokines étaient reconnues seulement pour leur rôle dans la migration de cellules inflammatoires (majoritairement les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes/macrophages et les éosinophiles) vers les sites endommagés. Cependant, depuis quelques années, leur implication dans l'homéostasie cellulaire, le développement, ainsi que le fonctionnement du système immunitaire devient de plus en plus évidente (Horuk et Peiper, 1996 ; Zlotnik et Yoshie, 2000). La sécrétion de chimiokines peut être déclenchée par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF α qui sont présentes dans le cœur infarci et participent à l'initiation de la réponse inflammatoire (Graves et Jiang, 1995).

Il y a 4 classes distinctes de chimiokines, selon l'arrangement des résidus cystéines à l'extrémité N-terminale, soient : C (lymphotactine), CC, CXC et CX₃C (fractalkine). Le SDF-1 α ou CXCL12 fait partie de la classe

CXC, ce qui signifie que les deux cystéines de l'extrémité N-terminale sont séparées par un autre acide aminé (aa). Les chimiokines agissent sur des récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G. La majorité des chimiokines peuvent lier plusieurs récepteurs et la plupart des récepteurs peuvent avoir plus d'une chimiokine comme ligand (Zlotnik et Yoshie, 2000). Les récepteurs sont classifiés selon la même méthode que les chimiokines elles-mêmes, c'est-à-dire selon l'arrangement des cystéines de leurs ligands, suivi de la lettre R, pour récepteur. Cinq récepteurs de type CXCR (CXCR1 à CXCR5), 10 CCR (CCR 1 à CCR10), 1 CR1 (récepteur pour la lymphotactine) et finalement, 1 CX₃CR1 (récepteur de la fractalkine) ont été caractérisés (Tableau 1.1) (Gibejovà, 2000).

Table 1. CXC, C and, CX₃C Chemokine/Receptor Families

CXC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CXCL1	4q12-q13	GRO α /MGSA- α	GRO/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO β /MGSA- β	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	4q12-q13	GRO γ /MGSA- γ	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	4q12-q13	PF4	PF4	Unknown
CXCL5	4q12-q13	ENA-78	LIX?	CXCR2
CXCL6	4q12-q13	GCP-2	CK α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q12-q13	NAP-2	Unknown	CXCR2
CXCL8	4q12-q13	IL-8	Unknown	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.21	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	4q21.21	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	4q21.21	I-TAC	Unknown	CXCR3
CXCL12	10q11.1	SDF-1 α / β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	4q21	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	Unknown	BRAK/bolekine	BRAK	Unknown
(CXCL15)	Unknown	Unknown	Lungkine	Unknown
C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
XCL1	1q23	Lymphotactin/SCM-1 α /ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q23	SCM-1 β	Unknown	XCR1
CX ₃ C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CX3CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1
CC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q11.2	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	17q11.2	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	17q11.2	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)		Unknown	C10, MRP-1	Unknown
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3
(CCL9/10)		Unknown	MRP-2, CCF18 MIP-1 γ	Unknown
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)		Unknown	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	Unknown	CCR2, CCR3
CCL14	17q11.2	HCC-1	Unknown	CCR1
CCL15	17q11.2	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	Unknown	CCR1, CCR3
CCL16	17q11.2	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	16q13	TARC	TARC	CCR4
CCL18	17q11.2	DC-CK1/PARC AMAC-1	Unknown	Unknown
CCL19	9p13	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	2q33-q37	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	9p13	6CKine/SLC/exodus-2	6CKine/SLC/exodus-2/TCA-4	CCR7
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q11.2	MPIF-1	Unknown	CCR1
CCL24	7q11.23	MPIF-2/Eotaxin-2	Unknown	CCR3
CCL25	19p13.2	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	Unknown	CCR3
CCL27	9p13	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC ESkin	CCR10*

*We recently identified the receptor for CCL27, which has been named CCR10 (Homey et al., 2000).

While we have tried to include most of the names with which a particular chemokine has been described, we may have missed some; for this we apologize in advance. We have also tried to list the *main* receptors for each chemokine, although some may bind other receptors but may not be their primary ligands. A question mark indicates that the listed mouse homolog may not correspond to the listed human ligand (see text). A systematic name in parenthesis indicates that the human homolog has not yet been identified.

This provisional nomenclature proposal has been submitted to the International Union of Immunological Societies (IUIS) Subcommittee on Chemokine Nomenclature (chairman, R. Thorpe) for consideration as an internationally approved nomenclature.

TABLEAU 1.1 : Les chimiokines et leurs récepteurs chez l'humain et la souris.

Les quatre grandes classes de chimiokines et de récepteurs identifiées chez l'humain et la souris (Tableau extrait de Zlotnik et Yoshie, 2000).

1.3.2 Le SDF-1 α

Le SDF-1 fait partie de la grande classe CXC des chimiokines. Il porte aussi le nom de CXCL12 ou encore de *pre-B cell growth stimulating factor* (PBSF) qui est son nom d'origine. Les chimiokines de la classe CXC sont plus chimiotaxiques pour les neutrophiles (Saito et Chihara, 2001). Elles peuvent aussi induire l'angiogenèse (Strieter, 2005) en augmentant la biodisponibilité du VEGF (Du et al, 2008) et l'incorporation de cellules progénitrices endothéliales dans les vaisseaux en formation (Shao et al, 2008).

Le SDF-1 diffère des autres chimiokines qui possèdent des homologies entre elles et peuvent entrer en compétition pour le même récepteur (Dealwis et al, 1998). Contrairement aux chimiokines de la classe CXC qui sont transcrites à partir d'un gène sur le chromosome 4, le gène codant pour le SDF-1 se situe sur le chromosome 10 (Shirozu et al, 1995). Il existe, à ce jour, 6 isoformes du SDF-1, soit α , β , γ , δ , ε , ϕ . Les 4 derniers proviennent d'épissages alternatifs. Ils conservent les mêmes trois premiers exons, mais ils sont différents quant au quatrième. Les isoformes α et β sont connus depuis plusieurs années. Le SDF-1 α possède 89 aa, alors que le SDF-1 β en possède 93, les 4 aa de plus étant à l'extrémité C-terminale (Yu et al, 2006). Ce travail porte sur l'isoforme α qui possède un haut taux d'homologie interspèce, soit d'environ 95%. La norme concernant les autres chimiokines se situe à près de 69% de similitude, ce qui suggère un rôle fondamental de la chimiokine SDF-1 α (Crump et al, 1997).

L'hypoxie est le principal inducteur de migration cellulaire par le SDF-1 α . En effet, l'hypoxie induit l'expression de HIF-1 qui augmente le nombre de récepteurs CXCR4 sur les cellules, augmentant ainsi la migration cellulaire occasionnée par le SDF-1 α (Ceradini et al, 2004, Du et al, 2008,

Wang et al, 2008). Le facteur de croissance épidermoïde (EGF) augmente aussi l'expression de CXCR4 sur les cellules cibles, mais à un plus faible niveau (Phillips et al, 2005).

1.3.2.1 La structure du SDF-1 α

Le SDF-1 α est constitué de 89 aa regroupés en 3 feuillets β et 2 hélices α (FIG. 1.9). Plusieurs chimiokines doivent se dimériser pour être actives, mais le SDF-1 α est aussi actif en tant que monomère. Son activité réside majoritairement dans sa région N-terminale qui permet la reconnaissance et la liaison de la chimiokine au récepteur. Cette liaison, pour produire un effet optimal, se fait sur deux sites différents. En effet, la chimiokine possède une séquence RFFESH (arginine, phénylalanine (2), acide glutamique, sérine, histidine) dans sa boucle (aa 12 à 17) qui est nécessaire à une liaison optimale au récepteur. Par contre, ce seul motif n'est pas suffisant pour activer le CXCR4. Ainsi, l'activation est assurée par la liaison de la séquence en N-terminale de la chimiokine sur le récepteur. La liaison du motif RFFESH à la partie N-terminale du récepteur semble être la clef permettant l'accès au site de liaison de la séquence N-terminale de la chimiokine qui est située plus loin dans le récepteur (dans la région transmembranaire) (FIG. 1.10). Cette liaison complète induit un changement de conformation du récepteur et ainsi provoque la liaison avec une protéine $G\alpha_i$ et l'activation des voies de signalisation intracellulaire (Crump et al, 1997 ; Loetscher et al, 1998).

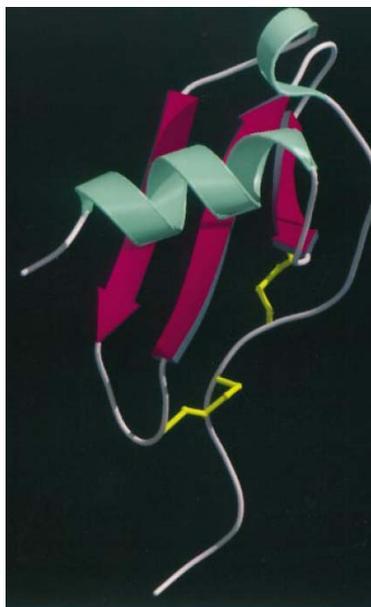


FIGURE 1.9 : Représentation graphique de la structure du SDF-1 α .

Le SDF-1 α est constitué de 3 feuillets β (rouge) et de 2 hélices α (vert). Cette photo correspond à la moyenne de 30 images et a été créée par le logiciel MOLSCRIPT et Raster 3D (Extrait de Crump et al, 1997).

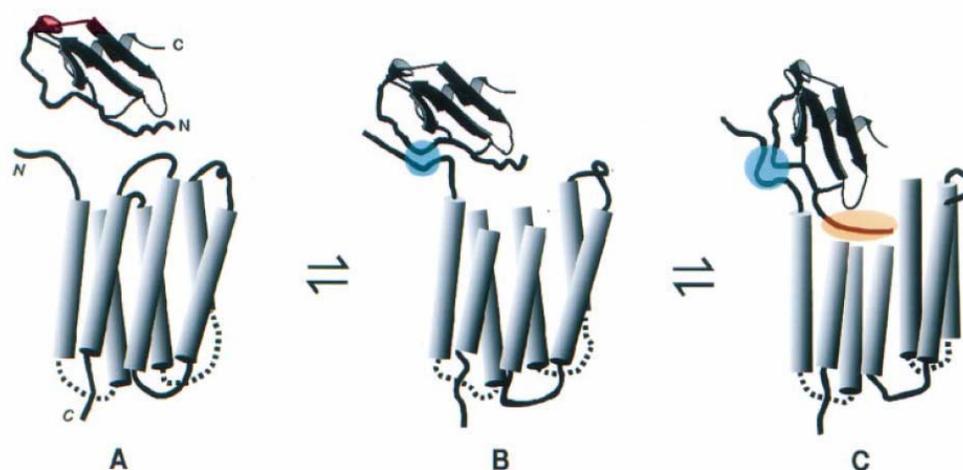


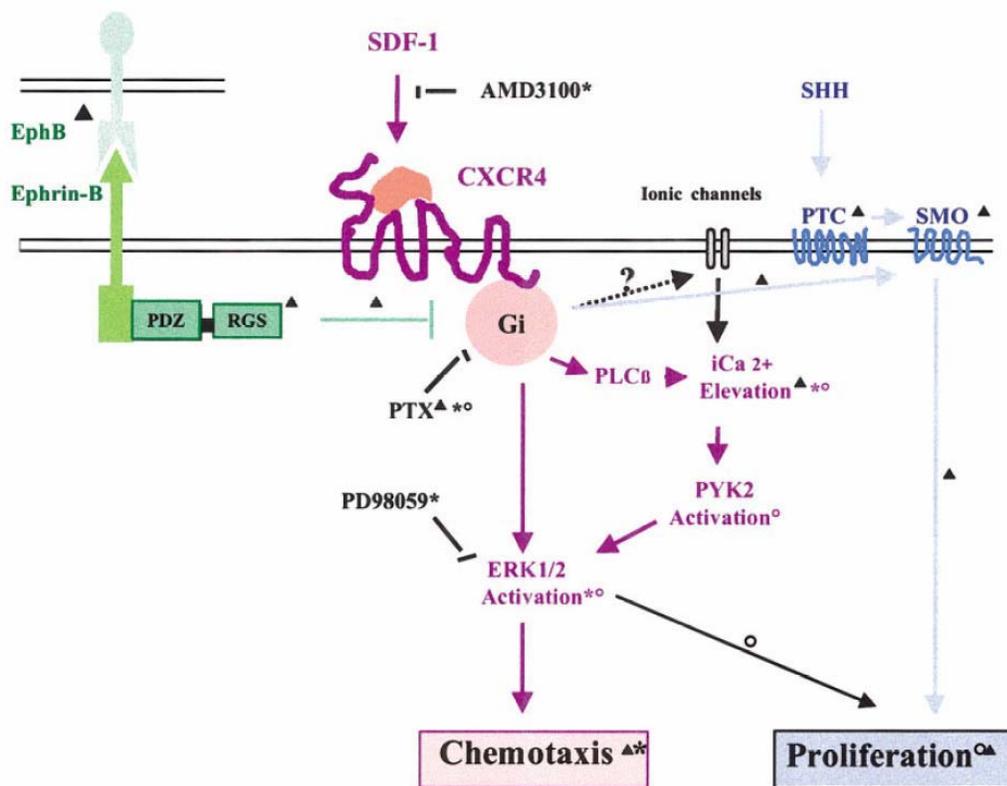
FIGURE 1.10 : Mécanisme de liaison du SDF-1 α à son récepteur, le CXCR4.

A : Le SDF-1 α approche du récepteur. B : La liaison du site RFFESH de la chimiokine interagit avec la séquence N-terminale du récepteur. C : Liaison de la séquence N-terminale de la chimiokine au récepteur suivi d'un changement de conformation ainsi que l'activation d'une protéine $G\alpha_i$ (Extrait de Crump et al, 1997).

1.3.2.2 Le récepteur CXCR4

Le seul récepteur connu du SDF-1 α est le CXCR4. Ce dernier est un récepteur à 7 passages transmembranaires qui est lié aux protéines G. Habituellement, les récepteurs aux chimiokines sont associés aux protéines G_i ou G_q (Haribabu et al, 1997). Étant donné que la réponse produite par le CXCR4 peut être inhibée par la toxine pertussique, il est suggéré que son effet se produise par une protéine G_i (Sanchez et al, 1997 ; Toth et al, 2004).

Le CXCR4 est présent sur de nombreux types cellulaires différents. Entre autres, il est retrouvé sur les cellules embryonnaires (Tran et al, 2004), sur les cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, neutrophiles) (Hesselgesser et al, 1998 ; Suratt et al, 2004), sur les cellules souches de la moelle osseuse (Möhle et al, 1998), sur la plupart des cellules endothéliales et épithéliales (Gupta et al, 1998 ; Kollet et al, 2003), sur les cellules nerveuses du système nerveux central (Ji et al, 2004) ainsi que sur les cellules cancéreuses. Il est connu que la liaison du SDF-1 α à son récepteur entraîne l'échange du GDP lié à la sous-unité G α pour un GTP, provoquant la dissociation de la protéine G en G α_i et G $\beta\gamma$. À la suite de cette dissociation, les deux parties de la protéine G activent des voies de signalisation intracellulaire indépendantes afin de produire les effets désirés comme la migration et la prolifération des cellules souches (Gibejovà, 2000) (FIG. 1.11). De plus, une cytoprotection est conférée aux cellules par l'activation de la voie de signalisation impliquant les kinases antiapoptotiques telles que ERK et Akt (protéine kinase B) (Hu et al, 2007).



Δ Demonstrated in cerebellar granule cells
 $*$ Demonstrated in neuronal progenitor cells
 \circ Demonstrated in astrocytes

FIGURE 1.11 : Voies de signalisation utilisées par le SDF-1 α dans le système nerveux central.

La liaison du SDF-1 α à son récepteur provoque l'activation d'une protéine G α_i . Cette activation va produire l'ouverture de canaux calciques induisant une augmentation du calcium intracellulaire. Ensuite, la voie des MAP Kinases (ERK 1/2) est activée et ceci provoque la migration cellulaire ou encore la prolifération cellulaire (Extrait de Lazarini et al, 2003).

Il est rapporté dans la littérature que les récepteurs des chimiokines sont internalisés à la suite de la liaison de leur ligand. Le SDF-1 α et le CXCR4 ne font pas exception à cette règle. En effet, la liaison du SDF-1 α au CXCR4 entraîne l'internalisation du complexe SDF-1 α /CXCR4. Le récepteur peut aussi être internalisé par la phosphorylation de sa partie C-terminale qui est intracytoplasmique. Cette phosphorylation peut être induite par la protéine kinase C (PKC). Ceci serait un processus de diminution de l'expression des récepteurs à la membrane (*downregulation*) (Haribabu et al, 1997 ; Signoret et al, 1998).

Au cours des dernières années, le récepteur CXCR4 a surtout été étudié pour son rôle dans l'internalisation du VIH dans les cellules immunitaires, particulièrement les lymphocytes T. Il est bien connu que la protéine gp120 de l'enveloppe du virus doit lier le récepteur CD4 sur les cellules afin d'y pénétrer. Récemment, il a été découvert que la gp120 pouvait aussi lier le CXCR4 et produire des effets néfastes sur les cellules. En effet, cette liaison peut entraîner l'apoptose des lymphocytes T CD8 positifs en augmentant la teneur en TNF α de la membrane des macrophages. La gp120 doit d'abord se lier au CD4, ce qui produit un changement de conformation dans la protéine gp120 la rendant capable de lier le CXCR4 avec une forte affinité (Amara et al, 1997; Toth et al, 2004). Parmi les récepteurs de chimiokines liant la gp120, les deux plus connus sont le CXCR4 et le CCR5, ce qui explique les nombreuses recherches effectuées sur ces deux récepteurs en particulier (Bleul et al, 1996 ; Amara et al, 1997 ; Schols et al, 1997 ; Popik et al, 1998 ; Rij et al, 1998 ; Lee et al, 2003).

Depuis qu'il est reconnu que le VIH peut lier des récepteurs de chimiokines, plusieurs thérapies ont été développées afin d'empêcher le virus de provoquer ses effets néfastes par cette voie. L'une d'elle utilise le SDF-1 α . La liaison du SDF-1 α à son récepteur provoque une internalisation du complexe SDF-1 α /CXCR4. Ainsi, la compétition du SDF-1 α et de la gp120

pour le récepteur ainsi que l'internalisation de ce dernier entraîne une inhibition des effets négatifs pouvant être provoqués par la liaison de la gp120 au CXCR4 (Amara et al, 1997). Une autre méthode thérapeutique pour inhiber la liaison de la gp120 au CXCR4 consiste à utiliser un antagoniste sélectif pour le CXCR4, soit l'AMD3100 (Schols et al, 1997).

1.3.3 Les rôles de l'axe SDF-1 α /CXCR4

L'axe SDF-1 α /CXCR4 est impliqué dans plusieurs conditions normales et pathologiques, de l'embryon à l'adulte comme le développement, l'inflammation ainsi que la migration cellulaire.

1.3.3.1 Le rôle du SDF-1 α dans l'embryogenèse

Le SDF-1 α a surtout été reconnu pour son implication dans la colonisation de la moelle osseuse par les cellules souches hématopoïétiques. À l'état embryonnaire, le principal site d'hématopoïèse est le foie (Cumano et al, 1996). Cependant, chez l'adulte, la moelle osseuse et la rate viennent remplacer le foie en tant que sites d'hématopoïèse. Ceci exige une migration des cellules souches hématopoïétiques du foie vers la moelle osseuse lors de l'embryogenèse. Il a été démontré que cette colonisation était inhibée chez les animaux déficients en SDF-1 (*Knock out*, SDF-1^{-/-}), suggérant un rôle essentiel de la chimiokine dans la colonisation de la moelle osseuse chez les embryons (Ara et al, 2003). De plus, le SDF-1 α est exprimé par les cellules de la moelle osseuse (ostéoblastes immatures, cellules stromales et endothéliales, cellules souches, etc.) afin de les retenir dans la moelle osseuse et de participer à leur prolifération, à leur différenciation et à leur survie (Lapidot et Kollet, 2002 ; Tavor et al, 2004).

De plus, le SDF-1 α possède un rôle important dans le développement embryonnaire de plusieurs organes, notamment le développement des systèmes nerveux, cardiovasculaire et immunitaire (Zou et al, 1998 ; Braun et al, 2002). En effet, le SDF-1 α et son récepteur sont très abondants chez les embryons de souris de 8 à 13 jours (McGrath et al, 1999).

1.3.3.2 Le rôle du SDF-1 α dans l'hématopoïèse et l'inflammation

Le premier rôle connu du SDF-1 α a été découvert par *Nagasawa et al* (1994). Ces auteurs croyaient avoir trouvé une nouvelle molécule participant à l'hématopoïèse des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils ont poussé leur étude et caractérisé cette molécule qu'ils nommaient PBSF, ils ont découvert qu'elle avait déjà été caractérisée par *Tashiro et al* (1993) et qu'elle se nommait le SDF-1 α . L'étude de *Nagasawa et al* démontre que le contact entre les cellules stromales de la moelle osseuse et les lymphocytes B immatures est essentiel à une maturation adéquate de ce dernier type cellulaire. À la suite de cette découverte, les recherches sur le SDF-1 α se sont multipliées et les rôles de la chimiokine s'avèrent de plus en plus importants. En effet, le groupe *Nagasawa et al* (1996) a démontré que le SDF-1 α participe à la prolifération des lymphocytes B non seulement dans la moelle osseuse, mais aussi dans le foie. De plus, selon cette étude, les animaux possédant une délétion pour le SDF-1 α (SDF-1 $\alpha^{-/-}$) ne survivent pas et présentent des malformations cardiaques (*Nagasawa et al*, 1996). Le SDF-1 α peut également jouer un rôle dans la maturation des thymocytes dans le thymus. Le SDF-1 α est présent en grande quantité dans le thymus et selon leur stade de maturation, les thymocytes expriment une quantité variable du CXCR4, ce qui entraîne une modification dans l'affinité du thymocyte pour le SDF-1 α (*Kim et Broxmeyer*, 1999). Il est important d'ajouter que le SDF-1 α n'est pas la seule chimiokine impliquée dans la prolifération et la maturation des lymphocytes B; l'IL-7, le *pre-B cell costimulating factor* (BST-1), le facteur de croissance pour l'insuline (IGF-1) et le *pre-B cell colony-enhancing factor* (PBEF) participent aussi à leur formation (*Kim et Broxmeyer*, 1999). Les lymphocytes B ne sont pas les seules cellules qui dépendent de l'axe SDF-1 α /CXCR4 pour leur maturation.

En effet, *Suratt et al* (2004) ont montré que les neutrophiles de la moelle osseuse nécessitent aussi l'implication du SDF-1 α .

De plus, le CXCR4 est exprimé par les mégacaryocytes. Ces cellules sont dérivées de cellules hématopoïétiques CD34 positives et sont responsables de la formation des plaquettes. Le SDF-1 α entraîne la migration des mégacaryocytes à travers la couche de cellules endothéliales de la moelle osseuse et permet la formation éventuelle des plaquettes (Hamada et al, 1998; Wang et al, 1998). Les mécanismes de cette migration transendothéliale ne sont pas encore élucidés. Par contre, il est bien connu que le SDF-1 α joue un rôle important dans la migration et ce, par l'augmentation du VEGF. Ceci pourrait être un des mécanismes expliquant la migration des mégacaryocytes. Cependant, le SDF-1 α ne pas permet la prolifération ou la maturation de ce type cellulaire (Majka et al, 2000).

Le SDF-1 α possède un rôle important dans toutes les maladies inflammatoires notamment l'arthrite. En effet, une augmentation de l'expression du SDF-1 α est démontrée dans les articulations présentant de l'arthrite. Une étude par *De Klerck et al* (2005) démontre qu'après un traitement avec de l'AMD3100, un inhibiteur sélectif du CXCR4, l'infiltration de cellules leucocytaires diminue grandement dans les articulations, diminuant significativement les inconforts occasionnés par la maladie. Ce phénomène est aussi présent dans les maladies de type allergique (Sergejeva et al, 2005).

1.3.3.3 Le rôle du SDF-1 α dans la chimiotaxie

Le SDF-1 α est aussi reconnu pour son effet chimiotaxique. Toutes les chimiokines possèdent un rôle de chimiotaxie, surtout pour les cellules

inflammatoires. Par contre, toutes les chimiokines n'ont pas la même affinité pour attirer les mêmes types de cellules inflammatoires. Par exemple, la chimiokine IL-8 (type CXC) provoque la migration de neutrophiles plus particulièrement, alors que le MCP-1 (type CC) a plus d'affinité pour les monocytes, les éosinophiles et les lymphocytes. Le SDF-1 α possède la capacité de recruter les lymphocytes, les cellules mononucléaires telles les monocytes/macrophages ainsi que les neutrophiles vers les sites lésés (Bleul et al, 1996 ; Zou et al, 1998 ; Suratt et al, 2004). Il est important de noter que les neutrophiles de la moelle osseuse répondent plus au SDF-1 α que ceux en circulation en raison de la plus grande expression du récepteur CXCR4 sur les neutrophiles en maturation (Suratt et al, 2004). Ainsi, l'axe SDF-1 α /CXCR4 peut induire la mobilisation des neutrophiles. Par exemple, lors d'une infection bactérienne, les lipopolysaccharides (LPS) présents sur la bactérie ont la capacité de diminuer l'expression du CXCR4 sur les neutrophiles de la moelle osseuse. Ceci diminue l'effet du SDF-1 α sur ces derniers et permet leur mobilisation de la moelle osseuse vers la circulation (Kim et al, 2007). Ce qui peut être considéré comme un phénomène adaptatif qui aide l'organisme à combattre le pathogène.

Le SDF-1 α peut induire la migration de cellules neuronales, de cellules endothéliales progénitrices (Hesselgesser et al, 1997 ; Augustin, 1998 ; Yamaguchi et al, 2003) et de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques CD34 positives (cellules indifférenciées pouvant produire plusieurs types de cellules sanguines) (Möhle et al, 1998). En provoquant la chimiotaxie et la prolifération des cellules endothéliales et des astrocytes, le SDF-1 α peut entraîner la croissance des tumeurs dans le cerveau et guider la destination des futures métastases. Aussi, le SDF-1 α intervient dans la régénération des fibres nerveuses, dans l'activité neuronale ainsi que dans l'inflammation en provoquant l'apoptose des astrocytes (Lazarini et al, 2003). Théoriquement, les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse logent dans des niches. Elles peuvent migrer de niche en niche ainsi que vers

l'extérieur de la moelle osseuse selon les gradients du SDF-1 α (majoritairement) (Aiuti et al, 1997). L'activation de molécules d'adhésion telles que le *very late antigene-4* et le *very late antigene -5* (VLA-4, VLA-5), le *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) et le CD44 (Tavor et al, 2004) est aussi nécessaire à leur sortie de la moelle osseuse.

Les mécanismes par lesquels les cellules souches passent de la moelle osseuse au sang ne sont pas bien connus. Il est clair que le SDF-1 α y joue un rôle important. Dans la moelle osseuse, les niveaux du SDF-1 α sont supérieurs par rapport au sang, parce que cette région est partiellement ischémique (niveaux de HIF-1 élevés) (Ceradini et al, 2004 ; Ceradini et Gurtner, 2005 ; Lapidot et al, 2005). Le SDF-1 α se lie à son récepteur CXCR4 sur les cellules, retenant ainsi les cellules à cet endroit. Pour mobiliser les cellules vers le sang, il est absolument nécessaire d'avoir une diminution de l'expression du CXCR4 sur les cellules de la moelle osseuse. Cette diminution de l'expression du récepteur est présente sur les cellules matures et fait en sorte que le SDF-1 α a moins d'effet sur ces dernières et elles peuvent migrer dans la circulation (Lapidot et Petit, 2002). Ce phénomène de recrutement cellulaire peut être impliqué dans la réparation tissulaire (Kayali et al, 2003). Lorsqu'un organe est endommagé, par exemple le cœur infarci, il a été démontré que l'ischémie induit la production de la protéine HIF-1 par les cellules endothéliales. Cette dernière provoque l'augmentation de l'expression du SDF-1 α dans l'organe affecté (Ceradini et al, 2004 ; Ceradini et Gurtner, 2005 ; Lapidot et al, 2005). À l'approche du cœur endommagé, le gradient du SDF-1 α est donc plus élevé dans le cœur infarci que dans le sang. Les cellules souches de la moelle osseuse seront stimulées par le SDF-1 α causant la réexpression du CXCR4.

Afin d'induire la migration cellulaire, le SDF-1 α se lie à son récepteur CXCR4 et active plusieurs voies de signalisation. Le SDF-1 α induit la phosphorylation de la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) pour induire la

migration cellulaire (Curnock et Ward, 2003). De plus, le SDF-1 α entraîne une augmentation du calcium intracellulaire ainsi que la phosphorylation de protéines impliquées dans la restructuration du cytosquelette telles que le *Related adhesion focal tyrosine kinase* (RAFTK), la paxilline, le *p130 crk-associated protein* (p130^{cas}) et les *mitogen activated protein kinase* (MAP Kinases) (FIG. 1.11). RAFTK est une molécule impliquée dans la coordination des signaux au cytosquelette et au noyau. La paxilline est une composante majeure du cytosquelette impliquée dans les foyers d'adhésion. Quant à p130^{cas}, c'est une molécule de signalisation qui participe à la formation de foyers d'adhésion qui sont cruciaux dans l'adhésion et la migration cellulaire. La voie des MAP Kinases est impliquée dans la prolifération, le cycle cellulaire et la migration cellulaire (Dutt et al, 1998 ; Ganju et al, 1998). Le SDF-1 α augmente aussi la production de MMP qui dégradent la MEC afin de permettre la migration cellulaire (Janowska-Wieczorek et al, 2000).

1.3.3.4 Le rôle du SDF-1 α dans l'apoptose

Le SDF-1 α est une chimiokine anti-apoptotique. Dans les cellules souches hématopoïétiques (Lataillade et al, 2002) et les cellules pancréatiques (Kayali et al, 2003), le SDF-1 α a un rôle anti-apoptotique en diminuant la fragmentation de l'ADN et en augmentant l'expression d'une protéine anti-apoptotique, la *B-cell lymphoma* (bcl-2) (Lataillade et al, 2002). Par contre, comme il a déjà été mentionné, la protéine gp120 du VIH a la capacité de lier le récepteur CXCR4. Il a été démontré que cette liaison induisait l'apoptose des cellules T (Herbein et al, 1998) et des cellules neuronales du cortex (Corasaniti et al, 2001). Le groupe de *Corasaniti et al* (2001) a aussi démontré que l'administration du SDF-1 α dans le cerveau de

rat réduisait l'apoptose causé par la liaison de la gp120 en diminuant la production de la cytokine pro-apoptotique IL-1 β .

1.3.3.5 Le rôle du SDF-1 α en tant qu'inotrope négatif sur le cœur

En inhibant l'ouverture des canaux calciques de type L dépendants de l'AMP cyclique (AMPc) au niveau des cardiomyocytes, le SDF-1 α a un effet inotrope négatif sur le cœur. L'inhibition de l'influx de calcium dans le cardiomyocyte réduit la capacité de contraction de la cellule. Par contre, cet effet ne se fait sentir qu'en présence d'une dose supraphysiologique de calcium ou encore à la suite de la stimulation du système sympathique (représenté dans l'étude de Pyo et al (2006) par la stimulation à l'isoprotérénol). Ceci suggère qu'à la suite d'un IM, l'activation du système sympathique confère un rôle d'inotrope négatif à SDF-1 α qui est d'ailleurs augmenté après l'IM (Pyo et al, 2006).

1.3.3.6 Le rôle du SDF-1 α dans l'angiogenèse

L'angiogenèse représente aussi une autre cible de la liaison du SDF-1 α à son récepteur. Le récepteur est présent sur les cellules endothéliales et son expression est augmentée après un traitement avec des facteurs angiogéniques comme le VEGF. De plus, il a été démontré que la stimulation de cellules endothéliales de la microcirculation avec le SDF-1 α provoque une augmentation de la production du VEGF (Mirshahi et al, 2000; Du et al, 2008). En condition pathologique telle que les ulcères gastriques, le SDF-1 α joue un rôle dans la formation de la cicatrice ainsi que dans la maturation de nouveaux vaisseaux (Akimoto et al, 2002). Ainsi, le SDF-1 α est impliqué dans l'angiogenèse au niveau des régions endommagées en participant à la

migration de cellules progénitrices endothéliales (Urbich et Dimmeler, 2004; Shao et al, 2008) et en augmentant le VEGF (Du et al, 2008). De plus, il est connu dans la littérature que le SDF-1 α est exprimé par les cellules tumorales et pourrait participer à l'angiogenèse dans les tumeurs solides. Ce processus a déjà été démontré dans le cancer de la prostate (Taichman et al, 2002), du rein (Schrader et al, 2002), du pancréas (Koshiba et al, 2000), du côlon (Zeelenberg et al, 2003), du sein (Muller et al, 2001), du poumon (Kijima et al, 2002), des ovaires (Scotton et al, 2002) et du cerveau (Sehgal et al, 1998). Ceci suggère que dans le cœur infarci, la chimiokine pourrait induire la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux dans la cicatrice et ainsi participer à la reperfusion du tissu lésé.

1.3.3.7 Le rôle de l'axe SDF-1 α /CXCR4 dans l'infarctus du myocarde

À la suite d'un IM, il y a augmentation de l'expression du SDF-1 α dans le cœur. Par contre, le site précis de l'élévation de l'expression du SDF-1 α n'a pas été déterminé (VGNI ou région infarctée). Cependant, une étude suggère qu'une lésion dans le nerf hypoglosse gauche induit une augmentation de l'expression du SDF-1 α seulement au site de la lésion et non dans la zone contralatérale (Ji et al, 2004). Ceci suggère que l'expression du SDF-1 α produite par l'IM pourrait être située seulement dans la région infarctée. Une étude par *Askari et al* (2003) démontre que l'injection de fibroblastes transfectés afin de surexprimer le SDF-1 α dans la cicatrice cardiaque de rats (8 semaines après un IM) est bénéfique. Ce traitement augmente la migration de cellules souches de la moelle osseuse et la vasculogenèse de la région infarctée en plus d'améliorer la fonction ventriculaire. De plus, une étude d'*Abbott et al* (2004) démontre par l'administration de l'AMD3100 que le SDF-1 α est responsable de la migration des cellules souches hématopoïétiques présentes dans le cœur après un IM.

Dans la même étude, ils montrent que la surexpression par un adénovirus du SDF-1 α peut même augmenter la migration des cellules souches vers le myocarde infarci. Une autre étude par le groupe de *Kucia et al* (2004) démontre qu'il y a, dans la moelle osseuse, une population de cellules souches non hématopoïétiques qui présentent des marqueurs de cellules cardiaques (*homeobox protein Nkx2.5* (Nkx2.5), *GATA binding protein-4* (GATA-4) et *monocyte enhancer binding factor 2* (MEF2C) (facteurs de transcription essentiels au développement cardiaque)). Ces dernières sont mobilisées dans la circulation après un IM et peuvent migrer vers le cœur infarci en fonction d'un gradient du SDF-1 α (*Kucia et al*, 2004). Il est important de noter que l'expression du SDF-1 α est aussi augmentée dans d'autres pathologies cardiaques comme l'insuffisance cardiaque (*Valgimigli et al*, 2004). Malheureusement, avec l'âge, les cellules souches de toutes les espèces répondent moins à la chimiotaxie par le SDF-1 α (*Muller et al*, 2005). De plus, une étude récente effectuée par *Koch et al* (2006) démontre que l'injection transendocardiale du SDF-1 α dans la région péri-infarctus deux semaines après un IM entraîne une augmentation de la vasculogénèse dans cette région.

1.3.4 L'AMD3100

L'AMD3100 est un antagoniste sélectif du récepteur de SDF-1 α , le CXCR4. Il est composé de deux cyclames reliés par un cycle de 6 carbones (FIG. 1.12) (*Matthys et al*, 2001; *Hatse et al*, 2002). L'AMD3100 est aussi connu sous le nom de JM3100 (*De Clercq et al*, 1994) ou SID791 (*De Vreese et al*, 1996¹). L'administration de ce composé n'affecte pas les récepteurs testés lors de l'étude de *Haste et al* (2002), soient les CXCR1 à 3 et les CCR1 à 9, suggérant une sélectivité uniquement pour le CXCR4. Les bicyclames ont d'abord été étudiés pour leur potentiel d'inhiber l'entrée ainsi que la décapsulation du VIH dans les cellules inflammatoires (*De Clercq et al*,

1992 ; De Vreese et al, 1996² ; Schols et al, 1997). Comme déjà mentionné, l'AMD3100, en plus d'empêcher l'entrée du virus, parvient à inhiber l'effet apoptotique que peut provoquer la liaison de la gp120 au CXCR4 sur les lymphocytes T (Blanco et al, 2000). Par contre, son efficacité clinique chez des patients infectés par le VIH n'a pas été démontrée (Hendrix et al, 2000 ; Hendrix et al, 2004). Des recherches sont présentement en cours sur l'implication de l'AMD3100 dans la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques. Tel que déjà vu, l'axe SDF-1 α /CXCR4 est impliqué dans la rétention et le maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Un traitement avec de l'AMD3100 permet donc la libération de ces cellules hématopoïétiques CD34 positives dans le sang (Flomenberg et al, 2005). Elles peuvent ensuite être récoltées et utilisées pour la transplantation de cellules souches (Broxmeyer et al, 2005 ; Fruehauf et al, 2005; Liles et al 2005 ; Larochelle et al, 2006; Pelus, 2008). De plus, l'AMD3100 est présentement à l'étude chez des patients ayant une tumeur afin d'augmenter le nombre de cellules progénitrices dans leur sang pour qu'ils puissent se soumettre à un traitement de chimiothérapie (Fruehauf et Seeger, 2005). Le G-CSF est aussi utilisé comme mobilisateur de cellules souches de la moelle osseuse de type CD34 positives. Cependant, les cellules mobilisées par l'AMD3100 et le G-CSF sont différentes (Larochelle et al, 2006). De plus, l'AMD3100 est utilisé pour le traitement de certaines maladies inflammatoires impliquant la chimiokine SDF-1 α (Matthys et al, 2001). L'AMD3100 a un grand potentiel clinique, que ce soit au niveau des maladies rhumatoïdes, allergiques, les tumeurs et les cancers ainsi que la mobilisation de cellules souches et progénitrices dans le sang (De Clercq, 2005). L'AMD3100 permet aussi le recrutement de cellules souches de la moelle osseuse vers la région endommagée du cœur permettant un meilleur remodelage ventriculaire à la suite d'un IM (Misao et al, 2006).

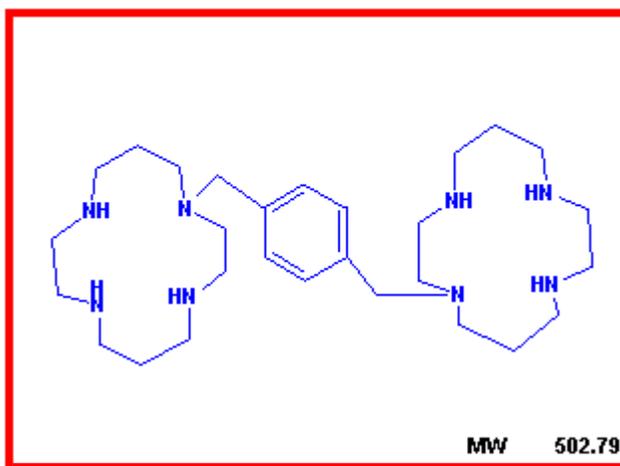


FIGURE 1.12 : Représentation de la structure de l'AMD3100.

L'AMD3100 est constitué de deux cyclames reliés par un cycle de 6 carbones. Cette molécule est un antagoniste sélectif du récepteur CXCR4 (Extrait de www.med.sc.edu:85/lecture/chemo.htm).

1.3.5 L'implication de l'axe SDF-1 α /CXCR4 dans le remodelage cardiaque aigu après un infarctus du myocarde

En condition hypoxique, il y a induction de HIF-1 qui est le principal régulateur du promoteur du SDF-1 α . Ainsi, à la suite d'une ischémie engendrée par le blocage d'une artère coronaire, l'ARNm du SDF-1 α (β et γ ne varient pas) est significativement augmentée dans le cœur (Pillarisetti et Gupta, 2001; Abbott et al, 2004). Le SDF-1 α peut être impliqué à plusieurs niveaux dans le remodelage ventriculaire après un IM. Malheureusement, l'effet principal reste indéterminé et est sujet à une controverse dans la littérature.

D'une part, le SDF-1 α pourrait avoir un effet bénéfique sur le remodelage ventriculaire après un IM aigu. D'abord, le SDF-1 α a un effet chimiotaxique sur les cellules souches de la moelle osseuse qui peuvent être impliquées dans l'angiogenèse, la vasculogenèse ainsi que la formation de nouvelles cellules présentant un phénotype cardiaque (Itescu et al, 2002, Yamaguchi et al, 2003; Urbich et Dimmeler, 2004). D'ailleurs, il a été démontré que l'injection de cellules souches de la moelle osseuse améliore significativement le remodelage ventriculaire après un IM (Orlic et al, 2001). Ensuite, le SDF-1 α favorise l'angiogenèse par l'augmentation de l'expression du VEGF (Mirshahi et al, 2000). Finalement, le SDF-1 α pourrait réduire la taille de la cicatrice par son effet anti-apoptotique. Le groupe de *Zhang et al* (2007) a démontré que cet effet anti-apoptotique résulte en une diminution de la mort des cardiomyocytes entraînant une amélioration de la fonction ventriculaire. Ces trois effets combinés pourraient être bénéfiques pour le remodelage cardiaque après un IM.

D'autre part, le SDF-1 α pourrait avoir un rôle néfaste sur le remodelage ventriculaire après un IM aigu. En effet, sa fonction d'inotrope négatif vient nuire à l'amélioration de la fonction ventriculaire (Pyo et al, 2006). Aussi, le SDF-1 α est connu pour son effet chimiotaxique sur les neutrophiles. Comme déjà mentionné, les neutrophiles ont un rôle néfaste sur le remodelage aigu après un IM par leur effet cytotoxique (Lucchesi, 1994; Frangogiannis et al, 2002; Ren et al, 2003).

Le rôle principal du SDF-1 α dans le remodelage ventriculaire après un IM pourrait donc être autant bénéfique que néfaste. Ainsi, la présente étude est la première à tenter de déterminer le principal rôle du SDF-1 α dans la phase aiguë du remodelage cardiaque après un IM. Pour ce faire, l'axe SDF-1 α /CXCR4 a été bloqué par de l'AMD3100 afin de déterminer l'impact biologique du SDF-1 α .

1.3 Objectifs

Plusieurs études montrent que l'injection de cellules souches dérivées de la moelle osseuse dans un cœur infarci améliore le remodelage cicatriciel ainsi que la fonction ventriculaire (Orlic et al, 2001; Hughes, 2002; Itescu et al, 2002; Lee et al, 2004; Olivares et al, 2004; Perin et Silva, 2004; Fazel et al, 2005; Orlic, 2005; Thompson et al, 2005; Martin-Rendon et al, 2008). L'efficacité de cette approche par thérapie cellulaire pourrait être améliorée si le recrutement de cellules souches injectées était augmenté vers la cicatrice cardiaque. Le SDF-1 α est une chimiokine reconnue pour son implication dans le recrutement de cellules souches de la moelle osseuse vers le cœur (Askari et al, 2003; Kayali et al, 2003; Abbott et al, 2004). Par contre, il a été démontré que le SDF-1 α peut avoir un effet néfaste sur le remodelage cardiaque après un IM, via le recrutement des neutrophiles. En effet, une diminution du recrutement des neutrophiles améliore le remodelage cardiaque après un IM (Liehn et al, 2008). Malgré le recrutement de cellules souches que provoque le SDF-1 α , cette chimiokine peut aussi produire des effets négatifs sur le remodelage cardiaque. Ainsi, le rôle de cette chimiokine dans la formation de la cicatrice cardiaque, son effet sur la pression ventriculaire et le remodelage du VGNI reste à déterminer. L'objectif principal de la présente étude est de caractériser l'effet du SDF-1 α sur le remodelage cardiaque et la formation de la cicatrice dans la phase aiguë après un IM. Pour ce faire, des rats et des souris sont traités avec le bloqueur sélectif du CXCR4, l'AMD3100.

Il a été montré que le SDF-1 α augmente dans le cœur ischémique. Cependant, la région précise de cette augmentation demeure inconnue (Pillarsetti et Gupta, 2001; Abbott et al, 2004). Le premier objectif est de localiser l'augmentation du SDF-1 α dans le cœur ischémique. Le deuxième objectif consiste à déterminer l'effet du SDF-1 α sur le remodelage et la

fonction ventriculaire dans les cœurs de rats adultes une semaine après l'IM par l'administration de l'antagoniste sélectif du CXCR4, l'AMD3100. Cette drogue a été administrée dans la nourriture des rats, 24 heures après la ligature complète d'une artère coronaire, et ce, pour 6 jours. À 7 jours, la fonction cardiaque et le remodelage du VGNI au niveau moléculaire ont été déterminés et l'effet sur la formation de la cicatrice a été évalué. L'hypothèse de cette étude est que le blocage de l'action physiologique du SDF-1 α avec de l'AMD3100 au niveau du cœur infarcté aurait un effet bénéfique sur la formation de la cicatrice et la fonction ventriculaire.

En effet, si le traitement avec de l'AMD3100 diminue la taille de la cicatrice chez les animaux traités, le remodelage du VGNI sera amélioré. Il est aussi possible que le SDF-1 α puisse lui-même influencer directement la réponse hypertrophique des cardiomyocytes. Malheureusement, l'approche *in vivo* ne permet pas de déterminer si le SDF-1 α produit un effet direct sur les cardiomyocytes. Pour répondre à cet objectif, l'effet direct du SDF-1 α sur la réponse hypertrophique des cardiomyocytes néonataux a été étudié.

Finalement, le but de la présente étude est de déterminer si la chimiokine SDF-1 α pourrait être une cible thérapeutique pour réduire la taille de la cicatrice cardiaque dans la phase aiguë après un IM.

Matériel et Méthodes

2.1 Manipulations des animaux

2.1.1 Ligature de l'artère coronaire et administration de l'AMD3100

Dans cette étude, des rats mâles Sprague Dawley âgés de 10 à 12 semaines ainsi que des souris mâles de 8 à 10 semaines (Charles River, St-Constant, QC, Canada) ont été divisés en 4 groupes soient : animaux témoins (témoin), animaux témoins traités avec de l'AMD3100 (AMD3100), animaux IM (IM) et finalement, animaux IM traités avec de l'AMD3100 (IM+AMD3100). Les animaux appartenant aux groupes IM ont subi une ligature complète de l'artère coronaire antérieure descendante gauche comme décrit dans le protocole de Nguyen (Nguyen et al, 2003). Les animaux sont anesthésiés avec un mélange d'isoflurane (CDMV) (rats : 3%, souris : 2,5%) et d'oxygène puis intubés avec un cathéter (rats : 18G; souris : 20G). À la suite de l'intubation, une dose préopératoire de buprénorphine est donnée aux animaux (TEMGESIC, Université McGill, rats : 0,01 mg/kg; souris : 0,05 mg/kg). La région d'intérêt est rasée et désinfectée avec de la chlorexidine 0,5% et une ouverture d'environ 1 cm est pratiquée sur le côté gauche du thorax à la hauteur du quatrième espace intercostal. Le pectoral transverse et le pectoral profond sont délicatement rétractés pour accéder au cœur. La ligature de l'artère est effectuée à l'aide d'un fil de soie noir tressé de taille 4-0 (JOHNSON & JOHNSON) pour les rats et un fil de nylon 10-0 pour les souris (JOHNSON & JOHNSON). Les côtes sont refermées à l'aide de fils 2-0 pour les rats et 4-0 pour les souris. Finalement, les muscles sont remplacés et une suture de la peau est pratiquée avec des broches pour petits animaux (FISHER). À la suite de la chirurgie, la buprénorphine (rats : 0,01 mg/kg; souris : 0,05 mg/kg) est administrée aux 4 à 8 heures (maximum de 4 injections). Durant la récupération, les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau pendant 24 heures.

Par la suite, l'antagoniste sélectif du CXCR4, l'AMD3100 (SIGMA) est mélangé à la nourriture de rat à raison de 1 mg par kg d'animal pour une période de 6 jours. Quant aux souris, elles reçoivent la même dose d'AMD3100, mais de façon intrapéritonéale (IP). Tous les 2 jours, les animaux sont pesés et la dose d'AMD3100 est réajustée. Les animaux témoins subissent un traitement semblable, toutefois sans ligature de l'artère coronaire. L'AMD3100 a été administré 24 heures après l'occlusion complète de l'artère coronaire afin de mimer les conditions retrouvées en clinique où le patient est traité après avoir subi un IM.

Les doses d'AMD3100 utilisées ont été déterminées de façon expérimentale. Dans la littérature, plusieurs articles documentent une administration de l'AMD3100 à des doses variables. Les doses utilisées dépendent de la réponse physiologique à observer. La dose utilisée dans la présente étude est basée sur une étude de *Rubin et al* (2003).

Comme déjà mentionné, la méthode d'administration de l'AMD3100 diffère entre les rats et les souris. D'abord, chez le rat, il est plus facile d'administrer la drogue dans la nourriture (malgré la plus faible biodisponibilité) que de façon IP. De plus, le laboratoire du *Dr Calderone* a validé cette approche pour le traitement pharmacologique des maladies cardiovasculaires (Mercier et al, 2002). Cependant, des études comparatives ont été effectuées afin de confirmer qu'il n'y a pas de différence entre les deux voies d'administration. Ainsi, chez le rat, de l'AMD3100 a été administré de façon IP et dans la nourriture et les résultats montrent que malgré les différentes voies d'administration, la taille de la cicatrice est diminuée. De plus, l'effet est plus prononcé lorsque la drogue est administrée via la nourriture (nourriture : $48 \pm 11\%$ de diminution de la taille de la cicatrice, $n = 9$; IP : $24 \pm 8\%$ de diminution de la taille de la cicatrice, $n = 7$). Ainsi, toutes les études suivantes ont été faites chez des rats qui recevaient de l'AMD3100 par voie orale. Chez la souris, la dose de l'AMD3100 est trop élevée

comparativement à la quantité de nourriture consommée par les souris. Ainsi, l'administration par voie IP a été préférée. Indépendamment du mode d'administration de l'AMD3100, une diminution similaire de la taille de la cicatrice est observée dans chacune des espèces étudiées.

Le laboratoire du Dr Calderone s'intéresse principalement aux événements impliqués dans la formation de la cicatrice, et ce, dans la phase aiguë. Dans cette optique, la formation de la cicatrice a été observée à 7 jours. En effet, à 7 jours, la cicatrice est bien délimitée et elle est facile à reconnaître. De plus, la réponse fibrotique est déjà établie par l'augmentation de l'ARNm du collagène $\alpha 1$ Type 3 dans la région non ischémique du VG. Enfin, une étude par *Pillarsetti et Gupta* (2001) a montré que le SDF-1 α reste élevé jusqu'à 6 semaines après un IM.

2.1.2 Mesure de la pression ventriculaire

Une semaine (7 jours) après l'IM, la pression ventriculaire est mesurée à l'aide d'un cathéter Millar (INTER V MEDICAL). Les rats sont anesthésiés avec un mélange de kétamine (50 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg) alors que les souris sont anesthésiées à l'aide de somnotol 65 mg/kg (pentobarbital). Les pressions sont mesurées sur une période de 30 secondes. Le cathéter Millar est inséré dans l'artère carotide droite afin de déterminer la pression artérielle systémique. Il est ensuite poussé vers le VG, ce qui permet de mesurer la pression ventriculaire gauche. La dérivée première de la pression ventriculaire gauche en fonction du temps est obtenue à l'aide du logiciel IOX (EMKA). Les dP/dt positives et négatives (+ dP/dt et - dP/dt) sont ainsi obtenues.

2.1.3 Sacrifices

Sept jours après l'IM et à la suite de la mesure de la pression ventriculaire, les rats et les souris sont sacrifiés en accord avec un protocole qui respecte les règles du *Conseil canadien de protection des animaux* et qui est approuvé par le *Comité de Soins aux Animaux de l'Institut de Cardiologie de Montréal*. Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'une dose de kétamine (50 mg/kg) et xylazine 10 mg/kg ou de somnotol (65 mg/kg) pour les rats et les souris respectivement. Après quoi les cœurs de rats sont prélevés et congelés dans l'azote liquide à -80°C (VITALAIR) en vue de l'homogénéisation ou congelés à -80°C dans le 2-méthylbutane (SIGMA) (coupes tissulaires au cryostat) pour les études tissulaires d'immunofluorescence. Avant la congélation dans l'azote liquide, les cœurs sont divisés (VGNI, cicatrice, septum, oreillettes, ventricule droit). En ce qui concerne les souris, les cœurs sont fixés dans la formaline 10% avant d'être coupés directement entre l'apex et la base pour les études d'immunohistochimie. Les deux morceaux ainsi obtenus sont conservés pour d'éventuelles coupes au microtome.

2.2 Utilisation des tissus

2.2.1 Coupes de tissus au cryostat

Les tissus congelés dans le 2-méthylbutane sont collés à l'aide d'OCT (*Tissus-Tek Optimal Cutting Temperature Compound*, VWR) sur une cryocassette carrée à usage industriel (SHANDON). Les coupes sont faites à une température environnant les -20°C et ont une épaisseur de 14 microns. Elles sont placées sur une lame de 25 X 75 X 1 mm (FISHER) préalablement traitée avec de la poly-L-lysine 0,1% (SIGMA), ce qui permet une meilleure

adhésion des coupes tissulaires. Les lames peuvent être conservées à -80°C ou utilisées immédiatement pour les études d'immunofluorescence.

2.2.2 Immunofluorescence sur les tissus pour le SDF-1 α , la nestine et l'actine α du muscle lisse

Les tissus sur lames sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% (FISHER), pH 7,2 (préparée à partir d'un tampon phosphate salin (PBS 1X filtré, pH 7,3), pendant 15 minutes et sont lavés 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X (contenant 136,9 mM de chlorure de sodium (NaCl, FISHER); 2,7 mM de chlorure de potassium (KCl, FISHER); 1,5 mM de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4 , SIGMA); 8,1 mM phosphate de sodium, dibasique, anhydre (Na_2HPO_4 , J.T. BAKER)), filtré à l'aide d'un papier filtre circulaire à porosité moyenne (FISHER). Les coupes tissulaires sont encerclées à l'aide d'un crayon à encre hydrophobe (Pap-Pen, ZYMED). Elles sont par la suite incubées 1 heure dans une solution de blocage contenant 0,5% de Triton X-100 (SIGMA) ainsi que 2% de *normal goat serum* (NGS, JACKSON LABORATORIES) et/ou 2% de *normal donkey serum* (NDS, JACKSON LABORATORIES), selon la nature de l'anticorps secondaire. À la suite du blocage des sites de liaison non spécifiques, les coupes sont incubées 24 heures à 4°C dans une solution contenant 0,1% de Triton X-100, 1% de NGS et/ou NDS ainsi que l'anticorps primaire. Les concentrations d'anticorps sont les suivantes : polyclonal anti-SDF-1 α de chèvre (1:50; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), monoclonal anti-nestine de souris (1:500; CHEMICON) monoclonal anti-actine α du muscle lisse de souris (1:200; SIGMA). Les coupes sont par la suite lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X filtré et incubées dans une solution incluant du triton X-100 à 0,1%, du NGS 1% et/ou du NDS 1% et l'anticorps secondaire à une concentration de 1:500 (pour tous les anticorps secondaires utilisés dans cette série d'expérience soient : anti-IgG de souris produit chez l'âne et

conjugué à la rhodamine (MOLECULAR PROBES) et anti-IgG de chèvre produit chez l'âne et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (JACKSON LABORATORIES)) pendant 2 heures à température de la pièce. Enfin, 3 derniers lavages de 5 minutes sont effectués et les lames sont montées avec du DABCO 0,4% (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, SIGMA)(dilué dans du PBS 1X filtré) auquel on ajoute 4 volumes de glycérol (FISHER). Le tout est scellé et observé à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence LSM 510 de Zeiss (AXIOVERT 100M). L'isothiocyanate de fluorescéine est détectable par un laser à l'argon émettant une longueur d'onde de 488 nm tandis que la rhodamine est visible grâce à un laser Hélium/Néon (He/Ne) qui émet une longueur d'onde de 543 nm. Les photos sont prises à l'aide d'un objectif de 63X avec une ouverture numérique de 1,4. Les témoins négatifs appropriés ont été faits, ceux-ci sont incubés avec l'anticorps secondaire seulement.

2.2.3 Coupes de tissus en paraffine

Les tissus sont d'abord fixés avec de la formaline 10%. Ensuite, ils sont imprégnés de paraffine. Ce processus comprend trois étapes. La première consiste à remplacer l'eau des tissus par de l'éthanol (FISHER) (déshydratation), la seconde substitue un solvant de la paraffine (celloïdine) à l'éthanol (éclaircissement) et finalement, le tissu est imprégné de paraffine (imprégnation). À la suite de cela, le tissu est enrobé dans un bloc de paraffine.

Les coeurs sont ensuite coupés en 2 entre la base et l'apex. Des coupes sériées en tranches minces de 6 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome. Ces coupes forment un ruban qui est déposé dans un bain d'eau chaude, ce qui a pour but de faire ramollir la paraffine. Les coupes peuvent alors être étalées sur une lame de verre préalablement traitée à la gélatine 1%.

2.2.4 Détection de l'infiltration de leucocytes et de neutrophiles dans la région infarctée

Les coupes tissulaires de 6 μm d'épaisseur sont réhydratées. Ce procédé comprend de nombreuses incubations qui représentent l'inverse de celles utilisées pour l'imprégnation dans la paraffine. D'abord, les tissus sont incubés 4 fois 5 minutes dans du xylène afin d'enlever la paraffine. Ensuite, des bains d'alcool en concentration décroissante servent à enlever le xylène et à préparer le tissu pour la réhydratation à l'eau (2 bains de 3 minutes dans l'alcool 100%, suivis de 3 minutes dans l'alcool 95% et de 3 minutes dans l'alcool 75%). Finalement, les lames sont trempées dans l'eau courante pendant 2 minutes.

Ensuite, les neutrophiles sont marqués à l'aide d'une coloration «naphtol AS-D chloroacetate esterase» (SIGMA) qui identifie l'estérase leucocytaire (neutrophiles et mastocytes seulement) par une teinte rougeâtre. De plus, l'infiltration leucocytaire a été mesurée par un marquage HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran). Pour cette coloration, les coupes sont incubées 2 minutes dans l'hématoxyline de Harris (coloration des noyaux) et ensuite immergées dans l'eau courante (3 minutes), dans l'alcool chlorhydrique 1% (4 fois) et de nouveau dans l'eau courante (5 minutes). Après une minute dans le carbonate de lithium qui bleuit les noyaux et 3 minutes dans l'eau courante, les coupes sont trempées dans le second colorant, la phloxine pour 30 secondes. Ce dernier marque toutes les structures excluant les noyaux. Les coupes sont lavées dans l'eau courante et elles subissent trois rinçages dans l'alcool 100%. Finalement, elles sont incubées 5 minutes dans le safran de Gatinais (coloration du collagène) et subissent 2 lavages de 30 secondes dans l'alcool 100% et 2 derniers lavages de 2 minutes dans le xylène afin de déshydrater les tissus à nouveau. Les lames sont ensuite montées à l'aide d'une colle, le parmount, et peuvent être

conservées à température pièce. Cette coloration permet de voir les noyaux en bleu; le cytoplasme, les fibres élastiques, les muscles ainsi que les érythrocytes en rose et finalement, le collagène en jaune orangé.

L'infiltration de leucocytes et de neutrophiles a été analysée chez les souris traitées et non traitées avec de l'AMD3100. La densité des neutrophiles de la région infarctée est normalisée à l'aide de la surface de la cicatrice (cm²). Par contre, vu l'abondance de leucocytes dans la région cicatricielle, leur densité a été déterminée selon une échelle de 1 à 4 où 1 correspond à une infiltration minimale; 2, une faible infiltration; 3, une infiltration modérée et 4, une infiltration marquée. Le décompte des neutrophiles a été fait sans savoir si l'animal avait été traité avec de l'AMD3100 (simple aveugle).

2.2.5 Isolement d'ARNm et étude de réaction en chaîne par polymérase en temps réel (*Real-Time PCR*)

Les tissus congelés dans l'azote liquide sont utilisés pour l'homogénéisation. Le VG, la cicatrice ou encore le VGNI est coupé en deux et la moitié est broyée à l'aide d'un polytron à 20 500 tours par minute (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, IKA-LABORTECHNIK) dans un tampon de lyse GIT (contenant 4M de guanidium thiocyanate (GIT) (FISHER), 25 mM de citrate de sodium, pH 7,0; autoclavé (FISHER), 0,5% de sarkosyl (N-lauryl sarcosine) (FISHER), le tout dissout dans de l'eau DEPC 0,1% stérile (diethyl pyrocarbonate, SIGMA)) auquel est ajouté 0,7% de β -mercaptoéthanol (FISHER). Ils sont ensuite homogénéisés avec une seringue stérile et mis au repos sur glace pour une quinzaine de minutes. Les homogénats (environ 2 mL) sont ensuite transférés dans des tubes stériles de 15 mL (FALCON) et 200 μ L d'acétate de sodium 2M (FISHER), 2 mL de phénol pH 4,3 (FISHER) et 400 μ L de chloroforme (FISHER) sont incorporés à la solution. À la suite

de l'addition de chacune de ces substances, le mélange est agité par inversion pendant environ 10 secondes. Les échantillons sont refroidis sur glace pendant 15 minutes et centrifugés à 4000 RPM, à 4°C pour 20 minutes. La phase supérieure contenant l'ARNm est recueillie et un volume d'isopropanol (Propanol-2, FISHER) est ajouté à la solution qui est incubée à -20°C pendant 48 heures. Les spécimens sont ensuite centrifugés (dans les mêmes conditions que précédemment) et les culots sont recueillis et séchés à l'air. Par la suite, ils sont dissous dans du GIT additionné de 0,7% de β -mercaptoéthanol et transférés dans des tubes de 1,5 mL (PROGENE) stériles; un volume d'isopropanol est ajouté et la solution est refroidie à -20°C pendant 48 heures. Finalement, les échantillons sont centrifugés à 10 000 RPM à 4°C pendant 10 minutes, les culots sont lavés 3 fois avec de l'éthanol 75% à -20°C et dissous dans de l'eau DEPC 0,1% (55 μ L). L'absorbance de chaque échantillon (5 μ L de ce dernier resuspendus dans de l'eau stérile) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTRONIC INSTRUMENTS) à des longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm. Chaque échantillon est alors comparé à un « blanc » contenant 5 μ L d'eau DEPC 0,1% dissous dans l'eau stérile. La concentration en ARNm est ensuite calculée en multipliant par un facteur de 8 la densité optique mesurée à 260 nm et les échantillons sont conservés à -80°C.

La première étape de la réaction en chaîne par polymérase en temps réel est de rétrotranscrire l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) qui sera par la suite amplifié par la PCR. Cette étape de synthèse de l'ADNc se nomme transcription inverse. Premièrement, il faut identifier un échantillon standard, habituellement le plus concentré en ARNm. Ce dernier est dilué à une concentration de 1 μ g/ μ L dans un volume total de 10 μ L (volume complété avec de l'eau DEPC 0,1%). À cette solution, 1 μ L de pdN6 (hexadésoxynucléotide de séquence aléatoire), une chaîne de 6 nucléotides qui vient se fixer sur l'ARNm au hasard ainsi que 1 μ L (1 μ g/ μ L) de dNTP

(désoxynucléotide triphosphate), qui est un mélange de tous les nucléotides libres, sont ajoutés pour un volume final de 12 μL . Pour les échantillons à doser ainsi que le témoin négatif, la concentration en ARNm est de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les échantillons et le standard sont ensuite chauffés à 65 °C pendant 15 minutes et gardés sur glace 5 minutes afin de fixer les pdN6. Ensuite, 2 μL de 0,1 M DTT (dithiothréitol), un agent réducteur qui aide au fonctionnement de l'enzyme, la MMLV-RT (transcriptase inverse dérivée du virus des leucémies murines Moloney) (200 U/ μL), l'enzyme principale, sont ajoutés à la solution afin de synthétiser l'ADNc. De plus, 1 μL de RNase OUT est ajouté à la solution afin d'inhiber toute activité de RNase contaminante. Finalement, 4 μL de «buffer 5X First strand» sont ajoutés pour un volume final de 20 μL . Dans les témoins négatifs, la MMLV-RT est remplacée par de l'eau DEPC 0,1%. Finalement, les tubes sont soumis au programme RT-MMLV suivant : 25 °C pendant 10 minutes, à 37 °C pendant 50 minutes, à 70 °C pendant 15 minutes et finalement à 4 °C.

À la suite de la formation de l'ADNc, l'étape de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est entamée. D'abord, une courbe standard est effectuée à l'aide de l'échantillon standard. Des quantités de 100 ηg ; 50 ηg ; 10 ηg ; 1 ηg ; 0,1 ηg ; 0,01 ηg sont utilisées pour créer la courbe standard. Une quantité de 2,5 ηg est utilisée pour les autres échantillons. 300 ηM d'oligonucléotides sens et anti-sens sont ajoutés à la solution. Les amorces utilisées dépendent de l'ARNm testé (voir tableau 2.1). Elles ont été obtenues par le programme *Ensembl Genome Browser* (www.ensembl.org). La spécificité de chaque amorce a été vérifiée par le programme *Blast* fourni par le *National Centre for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

ANP de rat	Sens : 5'-AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3' Anti-sens : 5'-ATTTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'
BNP (peptide natriurétique du cerveau de rat)	Sens : 5'-TTGGGCAGAAGATAGACCGGAT-3' Anti-sens : 5'-GGTCTTCCTAAAACAACCTCA-3'
collagène α_1 Type 3 de rat	Sens : 5'-GGACCTGGTTTCTTCTCACCC-3' Anti-sens : 5'-AGGTAGTTGCATCCCAATTCA-3'
SDF-1α de rat	Sens : 5'- TCCAAACTGTGCCCTTCAGAT-3' Anti-sens : 5'-TTTAATTTCCGGGTCAATGCACA
CXCR4 de rat	Sens : 5'-TAGCAGTGACCCTCTGAGGCGTTTG-3' Anti-sens : 5'GAAGCAGGGTTCCTTGTTGGAGTCA-3'
β-actine de rat	Sens : 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3' Anti-sens : 5'-GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'
SERCA2 de rat	Sens : 5'-TGTATCGACAGGACAGAAAGAGT-3' Anti-sens : 5'- TGATGAGCGAGACAGATTCACCTG-3'

TABLEAU 2.1 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR.

Voici la liste de toutes les amorces utilisées lors des expériences de RT-PCR.

Les témoins négatifs appropriés (sans MMLV-RT) sont effectués. À la suite de l'addition des oligonucléotides, le *Syber Green* est ajouté (15 μ L dans un total de 30 μ L). Le volume total de 30 μ L est complété à l'aide de l'eau DEPC 0,1%. Les échantillons sont par la suite soumis à une quarantaine de cycles, où chaque cycle correspond à 15 secondes à 95°C (dénaturation des brins) et 1 minute à 60°C (hybridation et polymérisation). L'expression de l'ARNm d'intérêt est toujours normalisée par rapport à

l'ARNm de la β -actine qui est ubiquitaire dans toutes les cellules et utilisée comme standard.

2.3 Étude cellulaire

2.3.1 Culture de cardiomyocytes à partir de tissus de rats néonataux

Des cardiomyocytes ventriculaires ont été cultivés à partir de rats Sprague-Dawley nouveaux nés (1 à 3 jours, Charles-River, Qc, Canada) selon le protocole décrit par le groupe du *Dr Calderone* (Calderone et al, 1998). D'abord, les ventricules sont retirés et placés dans du *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS, GIBCO BRL). Cette solution ne contient ni calcium ni magnésium. Les ventricules sont ensuite coupés en petits morceaux d'environ 1mm^2 et digérés à 4°C sur une période de 24 heures dans une solution de trypsine 0,1% (GIBCO BRL) diluée dans du HBSS. À la suite de cette incubation, 10 mL de sérum bovin foetal (FBS, GIBCO BRL) 7%, dilué dans le *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, GIBCO BRL) sont ajoutés aux tissus durant 5 minutes afin d'inhiber l'action de la trypsine. Par la suite, les tissus subissent 5 digestions à la collagénase 0,1% à 37°C (GIBCO BRL) (diluée dans le HBSS) dans le but de recueillir les cellules cardiaques. Après chaque digestion, les suspensions cellulaires sont récoltées et centrifugées à 4000 RPM, à 4°C pendant environ 3 minutes. Tous les culots cellulaires ainsi obtenus sont réunis dans du HBSS, puis lavés à deux reprises avant d'être complètement suspendus dans du FBS 7%. Les cardiomyocytes et les fibroblastes ventriculaires néonataux sont ensuite séparés selon leur rapidité d'adhésion à la surface du flacon (T75). Les fibroblastes ont la particularité de s'attacher beaucoup plus rapidement que les cardiomyocytes. Ainsi, les cellules sont incubées pour deux périodes de 45 minutes à 37°C dans des flacons T75 (75 cm^2).

Les cardiomyocytes en suspension sont rassemblés, comptés à l'aide d'un hémocytomètre de 0,0025 mm² (Neubauer Improved, LA FONTAINE) et cultivés pendant 24 heures dans du FBS 7% à une densité définie selon le type d'expérience pratiquée. Pour les études de croissance, les cardiomyocytes sont cultivés dans des plaques à 24 puits (p24, 200 mm²) à une densité de 300 cellules par mm². Enfin, pour les besoins du protocole expérimental, le milieu est changé pour un milieu riche en ITS (5 µg/mL d'insuline, 5 µg/mL de transferrine et 5 µg/mL de sélénite de sodium; (COLLABORATIVE BIOMEDICAL), 48 heures avant l'expérimentation.

Tous les flacons et plateaux (p100, p24, p6 et T75) proviennent de chez Falcon.

2.3.2 Mesure de la synthèse protéique par l'incorporation de leucine tritiée ([³H]-leucine)

Dans les études de croissance, les cardiomyocytes néonataux ont été traités pendant 24 heures avec différentes concentrations du SDF-1 α (CHEMICON) soient : 0,5; 1; 5; 10; 25 et 50 ng/mL. Trente minutes après l'addition du SDF-1 α , 1 µCi/mL de [³H]-leucine (ICN BIOMEDICAL INC.) (dilué dans de l'ITS) est ajouté aux cellules dans le but de déterminer la synthèse protéique. L'expérience achevée, les cellules sont lavées avec 1 mL de PBS 1X à 4°C puis traitées pendant 1 heure à 4°C dans 1 mL d'acide trichloracétique 5% (TCA, SIGMA), afin de précipiter les protéines. Par la suite, les précipités protéiques sont lavés à l'eau nanopure à 4°C et resuspendus dans 500 µL d'hydroxyde de sodium 0,4% (NaOH) pour une période de 24 heures à 4°C, ce qui décolle les précipités du fond du puits. La plaque est ensuite grattée et le contenu de chaque puits est transféré dans une fiole à scintillation de 6 mL (WHEATON) à laquelle 5 mL de liquide à

scintillation (Universol, MP BIOMEDICALS) sont ajoutés. L'incorporation de la leucine tritiée dans les précipités protéiques (exprimée en CPM (coups par minute)) est mesurée dans un compteur *Beckman* et les graphiques sont présentés en pourcentage de changement par rapport au niveau basal. Ce dernier représente l'activité de base des cellules qui est mesurée par l'addition de 1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H]-leucine à des cellules non traitées.

L'effet de l'antagoniste du CXCR4, l'AMD3100 (23 $\mu\text{g/mL}$), sur la synthèse protéique a aussi été testé. Pour ce faire, de l'AMD3100 ainsi que la chimiokine SDF-1 α (25 ng/mL) sont ajoutés en même temps sur les cellules pour 24 heures. À la suite de ce traitement, les cellules ont subi les mêmes étapes qu'expliquées précédemment. Les expériences précédentes ont été refaites sur des cellules hypertrophiées. Pour induire l'hypertrophie, les cellules ont été prétraitées avec 1 μM de noradrénaline (NA/artérénol, SIGMA) pour 24 heures. Après le prétraitement, elles ont été soumises à 24 heures de traitement avec les mêmes concentrations du SDF-1 α que précédemment. De plus, le rôle de l'AMD3100 sur les cellules hypertrophiées a aussi été vérifié selon le protocole expliqué ci-haut.

2.4 Méthodes statistiques

Plusieurs tests statistiques ont été utilisés pour cette étude. D'abord, un test-T bilatéral non pairé de student a été utilisé pour vérifier la différence entre deux groupes (traités et non traités). L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour vérifier la différence entre les courbes après la stimulation par le SDF-1 α versus NA+SDF-1 α . Finalement, l'analyse de variance 2 way (2 way ANOVA) a été utilisée lorsqu'il y avait 4 groupes différents à comparer. La différence significative pour les tests ANOVA et 2 way ANOVA a été déterminée par le test post hoc Neuman-keuls. Les différences entre les

moyennes dont la probabilité d'erreur α est inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) sont considérées comme statistiquement significatives.

Article

Article 1

Antagonism of stromal cell-derived factor-1 α reduces infarct size and improves ventricular function following myocardial infarction

Cindy Proulx, Viviane El-Helou, Hugues Gosselin, Robert Clement, Marc-Antoine Gillis, Louis Villeneuve & Angelino Calderone

Pflügers Archives (European Journal of Physiology)
Pflugers Arch. 2007 Nov; 455(2):241-250.

Antagonism of stromal cell-derived factor-1 α reduces infarct size and improves ventricular function following myocardial infarction

Cindy Proulx^{1,2,3}, Viviane El-Helou^{1,2,3}, Hugues Gosselin², Robert Clement², Marc-Antoine Gillis², Louis Villeneuve² & Angelino Calderone^{1,2,4}

¹ Département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Research Center, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

³ Both authors contributed equally to the study

⁴ Correspondance to: Angelino Calderone, PhD, Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger Est, Montréal, Québec, H1T 1C8 Canada. Tel: 514-376-3330 ext. 3710, Fax: 514-376-1355. E-mail: angelo.calderone@umontreal.ca

Abstract

To examine the biological impact of locally expressed stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) during the acute phase of remodelling following myocardial infarction (MI), rats were treated with the selective CXCR4 receptor antagonist AMD3100 (1 mg/kg; given 24 hrs post-MI and continued for 6 days). In 1-week post-MI rats, intense SDF-1 immunoreactivity was detected in scar-residing vessels, and SDF-1 α mRNA levels were significantly greater in the infarct region compared to the non-infarcted left ventricle (NILV). AMD3100 treatment of post-MI rats reduced infarct size, improved systolic function and partially suppressed the increased expression of ANP mRNA in the NILV. The latter finding indirectly suggests that SDF-1 α may have contributed to the hypertrophic response of the NILV. SDF-1 α treatment of neonatal rat ventricular myocytes (NNVMs) failed to promote protein synthesis. However, in hypertrophied NNVMs, SDF-1 α treatment further augmented ³H-leucine uptake and AMD3100 selectively inhibited the increase in protein synthesis. Collectively, these data support the existence of an SDF-1 α gradient in the damaged rat myocardium increasing towards the infarct region and highlight the novel observation that AMD3100 antagonism of the SDF-1 α /CXCR4 axis reduced scar expansion and improved contractility. In vitro data further suggest that SDF-1 α may have contributed to the hypertrophic response of the NILV.

Key words: rat, myocardial infarction, scar, hypertrophy, stromal cell-derived-1 α , AMD3100, cardiac myocytes

The efficacy of a cell-based therapeutic approach could be markedly improved if mobilization to the damaged region were enhanced [18, 23, 30]. (Verifier ref ordre alpha??)The chemokine stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) acting via its putative receptor CXCR4 was identified as an integral peptide involved in the recruitment of bone marrow-derived cells to damaged tissue [23, 30]. In the myocardium post-MI, an upregulation of SDF-1 α mRNA and protein expression were documented and at least one study detected SDF-1 α immunoreactivity in cardiac myocytes and blood vessels in the peri-infarct and infarct regions [2, 5, 14, 19]. Direct evidence supporting the chemotactic phenotype was provided by Dawn Abbot et al., as the forced expression of SDF-1 α in the heart by adenovirus delivery markedly enhanced the mobilization of exogenously administered bone marrow-derived cells [5]. Likewise, the grafting of cardiac fibroblasts containing an SDF-1 α expression vector in the scar of 8 week post-MI hearts promoted the recruitment of endogenous bone marrow-derived cells [2]. Collectively, the data support the premise that SDF-1 α could be employed as a therapeutic tool to augment the homing of bone marrow-derived cells to the infarcted heart.

Inflammation and the *de novo* formation of blood vessels represent putative events of reparative fibrosis and SDF-1 α has been implicated in both neutrophil recruitment and angiogenesis [26, 27, 29, 30]. Furthermore, a direct negative inotropic effect was demonstrated in isolated cardiac myocytes as SDF-1 α , acting via the CXCR4 receptor, inhibited cyclic AMP-mediated opening of L-Type Ca²⁺ channels [20]. Collectively, these data suggest that the reported increase of SDF-1 α expression in the ischemically damaged heart can influence both scar formation and ventricular function independent of its established chemotactic action on bone marrow-derived cells. Thus, to discern the biological impact of SDF-1 α during the early phase of reparative fibrosis post-MI, the highly selective CXCR4 receptor antagonist AMD3100 was administered 24 hrs after complete coronary artery ligation and continued for 6 days. The present study has demonstrated that AMD3100 therapy reduced infarct size, attenuated the

hypertrophic response of the non-infarcted left ventricle and concomitantly improved ventricular contractile function in 1-week post-MI rats.

Methods

Myocardial Infarct Model, Isolation of Neonatal Rat Ventricular Myocytes and Protein Synthesis in vitro

MI was induced in male Sprague-Dawley rats (10-12 weeks old; Charles Rivers, St.Constant, Quebec, Canada) by ligating the left anterior descending coronary artery. Prior to sacrifice, mean arterial pressure and left ventricular function was measured with a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2F, Millar instrument, Houston Texas), as previously described [17]. Data was analyzed with the program IOX version 1.8.9 (Emka Technologies; Falls Church, VA). To assess the role of SDF-1 α during the early phase of scar formation, the highly selective bicyclam CXCR4 receptor antagonist AMD3100 (Sigma) was administered to arbitrarily selected rats that underwent coronary artery ligation [3, 9]. Two routes of administration were examined and AMD3100 was either injected intraperitoneal (IP; 1 mg/kg) or added to normal rat chow (1 mg/kg) 24 hrs post-MI and continued for 6 days. The dose of AMD3100 employed in the present study was adapted from the study of Rubin et al [22]. Furthermore, because of the low oral bioavailability of AMD3100, a larger dose of the bicyclam was employed [10]. Our lab has validated the efficacy of adding pharmacological molecules to rat chow for the treatment of cardiovascular disease [15]. When AMD3100 was added to chow, rats were weighed every 2 days to adjust the dosage according to changes in body weight. Chow consumption was comparable between MI and AMD3100-treated MI rats. Infarct size and surface area in post-MI rats were measured, as previously described [17]. Regardless the route of administration, AMD3100 reduced infarct size, albeit the effect was more pronounced when the drug was added to rat chow ($48\pm 11\%$ decrease in scar weight; $n=9$) as compared to IP

injection ($24\pm 8\%$ decrease in scar weight; $n=7$). These data suggest that the larger dose of AMD3100 added to rat chow compensated for the low oral bioavailability and was pharmacologically active. Based on these data, all analyses were performed on MI rats receiving AMD3100 in rat chow. In the AMD3100 treated MI group, we were unable to acquire hemodynamic data from two rats. Neonatal rat ventricular myocytes were isolated from 1-3 day old Sprague Dawley rat pups, as previously described [4]. Experiments were performed on low density plated (200 cells/mm^2) neonatal rat ventricular myocytes maintained in serum-free media supplemented with insulin/transferrin/selenium [4]. Protein synthesis was assessed following the addition of $2\mu\text{Ci/mL}$ of ^3H -leucine (ICN Biomedicals Inc; Costa Mesa, CA) for a period of 24 hr prior to the end of the treatment protocol. Following the completion of the experimental protocol, neonatal ventricular myocytes were washed twice with PBS (4°C), and cold 5% trichloroacetic acid was added for 30 min to precipitate protein. The precipitates were washed twice with cold water and re-suspended in 0.4 M NaOH. Aliquots were counted in a scintillation counter. Lastly, the use and care of laboratory rats was according to the Canadian Council for Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

Real Time PCR

RT-PCR was performed by standard methodology on total RNA isolated from the normal left ventricle (excluding the septum), NILV (excluding septum) and scar of 1-week post-MI rats, as previously described [8]. Real time PCR was performed according to the manufacturer's instructions employing SYBR Green (Applied BioSystems). Primers for each gene were obtained from distinct exons that span an intron employing the program Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org). The sequence specificity of each primer was verified with the program Blast derived provided by the National Centre for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). The primers used were the following rat atrial natriuretic peptide, forward 5'-

AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3' and reverse 5'ATTTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'; rat brain natriuretic peptide, forward 5'-TTGGGCAGAAGATAGACCGGAT-3' and reverse 5'-GGTCTTCCTAAAACAACCTCA-3'; rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2), forward 5'-TGTATCGACAGGACAGAAAGAGT-3' and reverse 5'-TGATGAGCGAGACAGATTCACCTG-3'; rat collagen α_1 Type 3 forward, 5'-ggacctggtttctctcacc-3' and reverse 5'-AGGTAGTTGCATCCCAATTCA-3'; rat stromal cell-derived factor-1 α , forward 5'-TCCAAACTGTGCCCTTCAGAT-3' and reverse 5'-TTAATTTTCGGGTCAATGCACA; rat CXCR4, forward; 5'-TAGCAGTGACCCTCTGAGGCGTTTG-3' and reverse 5'-GAAGCAGGGTTCCTTGTTGGAGTCA-3', and rat β -actin, forward 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3' and reverse 5'-GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'. Appropriate negative controls (absence of cDNA) were used for each experiment.

Immunofluorescence Staining

Immunofluorescence was performed as previously described [8]. Three sham and MI rats were used for these experiments. Heart and scar weights were not attainable and hemodynamic measurements were not performed. Antibodies used include a goat polyclonal anti-SDF-1 α (1:50; Santa Cruz Biotechnology), a mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon) and a mouse monoclonal anti-smooth muscle α -actin (1:200; Sigma). Secondary antibodies were either a donkey anti-mouse IgG conjugated to rhodamine (1:500; Molecular Probe), or a donkey anti-goat IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (1:500; Jackson Laboratories). Normal mouse or goat IgG was used as a negative control. Immunofluorescence signal was detected with a 63X-oil 1.4 NA DIC plan apochromat objective mounted on a Zeiss Axiovert 100M confocal microscope. A fluorescence signal was not detected when tissue was incubated with conjugated secondary antibody alone.

Statistics

Data were presented as the mean \pm S.E.M, and (n) represents either the number of animals used per experiment or independent preparation of neonatal rat ventricular myocytes. Data was evaluated by either by a Student's unpaired t-test, ANOVA or a two-way ANOVA and significant difference determined by the Neuman-Keuls post-hoc test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Increased SDF-1 α Expression in the Infarct Region of 1-week Post-MI Rats

To directly discern the region implicated, SDF-1 α mRNA expression was examined in the hearts of 1-week post-MI rats by analyzing the discrete scar region and the viable myocardium separately. SDF-1 α mRNA was detected in the infarct region and expression was significantly greater as compared to the non-infarcted left ventricle (NILV) (Figure 1). These latter data support the existence of an SDF-1 α gradient in the damaged myocardium increasing towards the infarct region. An immunofluorescence approach revealed that vessels of varying calibre (20-200 μ m; lumen diameter) within the infarct region displayed intense SDF-1 α immunoreactivity in both nestin positive endothelial cells and/or smooth muscle α -actin positive vascular smooth muscle cells (Figure 2). However, the intensity of SDF-1 α staining in scar-residing vessels was not uniform and in some cases immunoreactivity was absent (Figure 2). By contrast, SDF-1 α immunoreactivity was either weak or absent in the preponderance of vessels residing in the NILV (Figure 2). Lastly, in contrast to that described in the infarcted mouse heart [5], SDF-1 α immunoreactivity was not detected in cardiac myocytes residing in the peri-infarct and/or infarct region of 1-week post-MI rats (data not shown).

Heart Weight, Scar Formation, and Hemodynamics in 1 week Post-MI Rats; Therapeutic Benefit of AMD3100

One week following coronary artery ligation, scar formation was associated with a significant decrease of left ventricular weight, LV/BW ratio, and contractile dysfunction (Tables 1 & 2). Body weight, heart weight, and left ventricular contractility in AMD3100-treated sham rats were similar to untreated sham rats (Tables 1 & 2). AMD3100 administration 24 hrs post-MI and continued for 6 days significantly reduced scar size and was associated with a concomitant increase in absolute LV weight and LV/BW ratio, as compared to untreated-MI rats (Table 1). The attenuation of scar expansion in AMD3100-treated MI rats led to a significant improvement in MAP, the rate of left ventricular contraction (dP/dt) and relaxation (-dP/dt) (Table 2). A similar trend was observed for LVSP in AMD3100-treated post-MI rats, but did not reach statistical significance. By contrast, elevated LVEDP observed in untreated post-MI rats persisted in AMD3100-treated MI rats (Table 2).

Gene Expression in 1 week Post-MI Rats; Therapeutic Benefit of AMD3100

The decreased expression of SDF-1 α mRNA in the NILV of 1-week post-MI rats was not associated with a change in CXCR4 mRNA levels (Figure 3). Consistent with previous studies, hypertrophic remodelling of the NILV was characterized by the increased expression of atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA and the concomitant downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) mRNA (Figure 3). Furthermore, a reactive fibrotic response was identified in the NILV as reflected by the increased expression of collagen α_1 Type 3 mRNA, as compared to sham rats (Figure 3). AMD3100 administration to sham rats had no effect on basal ANP, SERCA2, collagen α_1 Type 3 or CXCR4 mRNA levels in the left ventricle (Figure 3). However, a significant decrease of SDF-1 mRNA expression was observed in AMD3100-treated sham rats (Figure 3). In AMD3100-treated 1-week post-MI

rats, SDF-1 mRNA levels were not further decreased and CXCR4 mRNA expression remained unchanged (Figure 3). However, AMD3100 therapy led to a partial attenuation of ANP mRNA expression in the NILV, whereas SERCA2 mRNA levels remained reduced (Figure 3). Furthermore, the increased expression of collagen α_1 Type 3 mRNA in the NILV of untreated post-MI rats persisted following AMD3100 therapy (Figure 3).

The Biological Effects of SDF-1 α on Cardiac Cell Growth and SDF-1 α mRNA Regulation in Hypertrophied Neonatal Rat Ventricular Myocytes

The partial attenuation of ANP mRNA expression in the NILV of AMD3100-treated post-MI rats may reflect either a response secondary to the reduction of infarct size and/or the direct antagonism of a hypertrophic response elicited by SDF-1 α . To indirectly test the latter premise, neonatal rat ventricular myocytes were used as this *in vitro* cell model has been previously employed to assess the underlying mechanisms coupled to cardiac hypertrophy [4, 16]. The 24 hr exposure of ventricular myocytes to SDF-1 α failed to promote protein synthesis (Figure 4). To examine whether responsiveness to SDF-1 α was influenced by the presence of a pre-existing hypertrophic phenotype, neonatal rat ventricular myocytes were exposed to norepinephrine for 24 hrs prior to the administration of the chemokine. The 24 hr exposure of neonatal rat ventricular myocytes to norepinephrine increased protein synthesis ($42 \pm 5\%$ \uparrow versus untreated; n=3) and the response was maintained 48 hr later (Figure 4). The norepinephrine-mediated increase in ^3H -leucine uptake was associated with a concomitant induction of ANP and BNP mRNA levels (Figure 4). In norepinephrine-induced hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes, SDF-1 α treatment for 24 hrs led to a significant dose-dependent increase of ^3H -leucine uptake (Figure 4). To confirm that the SDF-1 α response observed in hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes occurred via the CXCR4 receptor, cells were pre-treated with 25 $\mu\text{g/ml}$ of AMD3100 prior to the addition of the chemokine. A previous study had demonstrated that 25 $\mu\text{g/ml}$ of AMD3100 abrogated the biological actions of

SDF-1 α in an *in vitro* setting [6]. AMD3100 had no effect on norepinephrine mediated ³H-leucine uptake but selectively abrogated the SDF-1 α mediated increase of protein synthesis in hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes (Figure 4).

In addition to blood vessels, cardiac myocytes have also been identified as a source of SDF-1 α [19, 23, 24] and the decreased expression in the NILV of 1-week post-MI rats reported in the present study may represent a secondary response to cardiac hypertrophy. To directly test the latter premise, SDF-1 α mRNA expression was examined in hypertrophied neonatal ventricular myocytes. The 24 hr exposure of ventricular myocytes to norepinephrine increased ANP and BNP mRNA levels, indicative of a hypertrophic response. In norepinephrine-induced hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes, SDF-1 α mRNA expression was significantly reduced (Figure 4).

DISCUSSION

The present study has revealed the existence of an SDF-1 α gradient in the damaged myocardium increasing towards the infarct region of 1-week post-MI rats. Within the scar, numerous vessels stained positive for SDF-1 α whereas immunoreactivity was either weak or absent in vessels residing in the viable myocardium. Administration of the selective CXCR4 receptor antagonist AMD3100 to post-MI rats reduced infarct size, improved left systolic function and partially attenuated the hypertrophic response of the NILV. *In vitro* experiments performed on neonatal rat ventricular myocytes indirectly suggest that SDF-1 α may have contributed to the hypertrophic response of the viable myocardium following complete coronary artery occlusion.

Several studies observed a transient upregulation of SDF-1 α mRNA expression in the heart during the acute phase (1-3 days) of remodelling following coronary artery ligation [2, 5, 14]. By contrast the study by Pillarisetti and Gupta [19] observed a significant increase of SDF-1 α mRNA

levels 1 week following coronary artery occlusion and remained elevated 6 weeks post-MI. Furthermore, at least one study suggested that increased SDF-1 α expression occurred preferentially in the ischemic region [5]. In the present study, SDF-1 α mRNA was detected in the infarct region and was significantly greater than the NILV of 1-week post-MI rats. Within the scar region, intense SDF-1 α immunoreactivity was observed in numerous vessels of varying calibre and staining was detected in vascular smooth muscle cells and endothelial cells. The latter observation was likewise reported in blood vessels residing in the peri-infarct and infarct region of the ischemically damaged mouse heart [5]. By contrast, SDF-1 α immunoreactivity was either weak or not detected in vessels residing within the viable myocardium of 1-week post-MI rats. Collectively, these data support the premise that the reported increase of SDF-1 α expression during the acute phase of post-MI remodelling occurred preferentially in vessels located in the ischemic region and further highlights the existence of an SDF-1 α gradient in the damaged myocardium increasing towards the infarct region. Lastly, in contrast to that observed in the infarcted mouse heart, SDF-1 α staining was not detected in cardiac myocytes residing in either the peri-infarct or infarct region of 1-week post-MI rats [5].

A postulated role of SDF-1 α in ischemically-damaged tissue including the heart involves the homing of bone marrow-derived stem cells to the infarcted region mediated by its only known G-protein coupled receptor CXCR4 [2, 3, 5, 23, 30]. However, several studies have provided evidence to suggest that SDF-1 α could potentially influence scar formation independent of its chemotactic action on bone marrow-derived stem cells [6, 11, 26]. Thus, to discern the impact of locally expressed SDF-1 α on scar expansion during the early phase of remodelling, post-MI rats were treated with the selective CXCR4 receptor antagonist AMD3100 (1 mg/kg) 24 hrs following complete coronary artery occlusion and continued for 6 days. AMD3100 administration to post-MI rats significantly reduced infarct weight and surface area, as compared to untreated post-MI rats. These data are the first to highlight a

therapeutic benefit of AMD3100 on scar formation and suggests that the preferential increase of SDF-1 α in the ischemic region following MI may have contributed to infarct expansion. The smaller infarcts detected in AMD3100-treated post-MI rats could be attributed to either an attenuation of the inflammatory response and/or mobilization of bone marrow-derived stem cells. SDF-1 α was reported to promote neutrophil recruitment and suppressing their infiltration following ischemic injury attenuated myocyte damage and concomitantly reduced infarct size [11, 26, 28]. Furthermore, AMD3100 treatment rapidly mobilized bone marrow-derived hematopoietic and endothelial progenitor cells into circulation and their subsequent recruitment to the ischemically damaged tissue represents a cellular substrate for *de novo* blood vessel formation [2, 3, 5, 13, 25, 30]. However, if bone marrow-derived stem cells did contribute to the therapeutic action of AMD3100 in post-MI rats, their homing to the damaged myocardium should have occurred via an SDF-1 α independent mechanism. Lastly, a partial inhibition of SDF-1 α mRNA expression was observed in sham rats following AMD3100 administration. Although the underlying mechanism implicated in the latter response remains presently undefined, the AMD3100-mediated downregulation of SDF-1 α mRNA may have limited the biological actions of the chemokine during the early phase of reparative fibrosis post-MI.

In AMD3100-treated post-MI rats, the increase in absolute LV weight and LV/BW ratio were secondary to smaller infarcts. Likewise, the amelioration of ventricular contractile function in AMD3100-treated post-MI rats was also directly related to smaller infarcts. However, AMD3100 can further improve contractile function independent of infarct size. A recent study by Pyo and colleagues demonstrated that SDF-1 α activation of CXCR4 on isolated cardiac myocytes inhibited the contractile response to increases in calcium and following isoproterenol stimulation [20]. The latter effects of SDF-1 α were blocked by AMD3100. Thus, the marked improvement of left ventricular contraction (+ dP/dt) in AMD3100-treated post-MI could be also related to an antagonism of the negative inotropic action of SDF-1 α . By

contrast, the persistent decrease of left ventricular $-dP/dt$ and elevated LVEDP in AMD3100-treated post-MI rats suggests that cellular events implicated in relaxation remain dysfunctional. Calcium uptake by SERCA2 plays an integral role in ventricular relaxation and decreased protein expression and activity were reported in cardiac myocytes isolated from 3-week post-MI rats (1,21,31). Although, protein content and activity were not measured in the present study, the persistent downregulation of SERCA2 mRNA in AMD3100-treated post-MI rats indirectly provides a plausible mechanism contributing to impaired relaxation. Moreover, a dysregulation in the phosphorylation or expression of phospholamban or the Na^+/Ca^{2+} exchanger may have also contributed to the inadequate effect of AMD3100 on ventricular relaxation post-MI [21, 31, 32]. Lastly, the persistent reactive fibrotic response in the viable myocardium of AMD3100-treated post-MI rats as reflected by the increased expression of collagen α_1 Type 3 mRNA may likewise compromise relaxation [12].

The partial suppression of ANP mRNA levels in the NILV of AMD3100-treated post-MI rats indirectly suggests that the reported increase of SDF-1 α in the ischemically damaged myocardium may have contributed in part to the hypertrophic response. To test the latter premise, neonatal rat ventricular myocytes were employed as this cell model has been previously utilized to assess the underlying mechanisms coupled to cardiac hypertrophy [4, 16]. In contrast to the hypertrophic response elicited by norepinephrine, SDF-1 α administration failed to stimulate promote protein synthesis in neonatal rat ventricular myocytes. However, the increased SDF-1 α expression in the post-MI heart occurred during the initiation of a hypertrophic response of the remaining viable myocardium. In this regard, the responsiveness of ventricular myocytes to SDF-1 α may be influenced by a pre-existing hypertrophic phenotype. Indeed, we have previously demonstrated that hypertrophy can significantly alter myocyte responsiveness to exogenous stimuli. The treatment of neonatal rat ventricular myocytes with the nitric oxide donor SNAP inhibited DNA synthesis and concomitantly increased the

phosphorylation status of ERK1/2 and p38 [7]. However, in hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes, SNAP mediated inhibition of DNA synthesis was partially attenuated and ERK1/2 and p38 phosphorylation was abrogated [7]. In the present study, hypertrophy likewise influenced the biological action of SDF-1 α . A significant concentration-dependent increase of protein synthesis was observed following the exposure of hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes to SDF-1 α . Reaffirming that the hypertrophic action of the chemokine occurred via the activation of CXCR4, the pre-treatment of hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes with AMD3100 selectively inhibited SDF-1 α stimulated protein synthesis. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate that SDF-1 activation of CXCR4 contributed to the hypertrophic growth of isolated neonatal rat ventricular myocytes. However, it is important to emphasize that neonatal and adult ventricular myocytes are not phenotypically identical and an extrapolation of these data to the adult setting must be made with caution. Thus, the *in vitro* findings indirectly support the premise that the partial regression of the hypertrophic response in the NILV of AMD3100-treated post-MI rats could be related in part to a direct antagonism of the SDF-1 α /CXCR4 axis.

An unexpected finding was the reduced expression of SDF-1 α mRNA in the NILV of 1-week post-MI rats versus both the infarct region and the LV of sham rats. The downregulation of SDF-1 α mRNA in the NILV versus the LV of sham rats suggested that expression may have been directly influenced by the hypertrophic growth of cardiac myocytes. Indeed, several studies have identified SDF-1 α expression in cardiac myocytes [19, 24], albeit its regulation in response to hypertrophy remains presently unknown. To directly test the consequence of hypertrophy on SDF-1 α mRNA expression, neonatal rat ventricular myocytes were exposed to norepinephrine. In addition to stimulating protein synthesis, norepinephrine significantly increased ANP and BNP mRNA expression. Co-incident with a hypertrophic response of neonatal rat ventricular myocytes, SDF-1 α mRNA expression was significantly

reduced. Thus, the latter finding strongly supports the premise that the attenuation of SDF-1 α mRNA expression was apparently secondary to the hypertrophic response of cardiac myocytes in the NILV. It is tempting to speculate that the partial attenuation of SDF-1 α mRNA expression in the viable myocardium may represent a negative feedback mechanism limiting both the hypertrophic and negative inotropic effect on cardiac myocytes.

The present study has demonstrated that increased SDF-1 α immunoreactivity was detected in vessels residing in the scar of 1-week post-MI rats and most likely contributed to the elevated expression of the transcript in the infarct region. Administration of the selective CXCR4 receptor antagonist AMD3100 24 hrs post-MI and continued for 6 days reduced infarct size, ameliorated ventricular contractile function and partially attenuated the hypertrophic response of the NILV. The improvement of LV dP/dt in AMD3100-treated post-MI rats may have been accentuated by alleviating the negative inotropic action on cardiac myocytes facilitated by SDF-1 α activation of the CXCR4 receptor [20]. *In vitro* experiments demonstrated that SDF-1 α was capable of contributing to the hypertrophic growth of neonatal rat ventricular myocytes thereby indirectly suggesting that the chemokine may have likewise participated in the hypertrophic response of the NILV following MI. However, the concomitant downregulation of SDF-1 α mRNA in the hypertrophied NILV may represent a negative feedback mechanism limiting the biological actions of the chemokine. Thus, based on our findings and the reported negative inotropic action, the use of SDF-1 α as a therapeutic approach to promote the trafficking of bone marrow-derived cells to the ischemically damaged heart should be re-evaluated.

Acknowledgements

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada and Quebec, Canadian Institutes of Health Research, and "La Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal". Dr. Calderone is a "Chercheur-Boursier

National du Fonds de la recherche en santé du Québec". I would like to thank France Thériault for excellent secretarial assistance.

Q:\Secrétariat Central\therfr\PUBL\Eur J Physiol\AMD3100_AC_ft\Manuscript.doc

References

1. Ahlers BA, Song J, Wang J, et al. (2005) Effects of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol* 98:2169-2176.
2. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. (2003) Effect of stromal cell-derived factor-1 on stem cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362:697-703.
3. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. (2005) Rapid mobilization of human and murine hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 201:1307-1308.
4. Calderone A, Abdelaziz N, Colombo F, Schreiber KL, Rindt H. (2000) A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocyte hypertrophy and gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 32:1127-1140.
5. Dawn Abbot J, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. (2004) Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 110:3300-3305.
6. De Klerck B, Geboes L, Hatse S, et al. (2005) Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R1208-R1220.
7. El-Helou V, Bel-Hadj S, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Calderone A. (2006) Nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis was attenuated in hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes. *Nitric Oxide* 14:316-326.
8. El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, et al. (2005) Resident nestin⁽⁺⁾ neural stem cells and fibres were detected in the normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* 46:1219-1225.
9. Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clerq E, Schols D. (2002) Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Letters* 527:255-262.

10. Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, et al. (2000) Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother* 44:1667-1673.
11. Hoffmeyer MR, Scalia R, Ross CR, Jones SP, Lefer DJ. (2000) PR-39, a potent neutrophil inhibitor, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol* 279:H2824-H2828.
12. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al. (2002) Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106:130-135.
13. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. (2003) Mobilization of hematopoietic progenitor cells in health volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102:2728-2730.
14. Ma J, Ge J, Zhang S, et al. (2005) Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 100:217-223.
15. Mercier I, Pham-Dang M, Clement R, Colombo F, Gosselin H, Calderone A. (2002) Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET_A receptor antagonist therapy: Absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol* 136:685-692.
16. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Robbins J, Grant SR, Olson EN. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-228.
17. Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Rouleau JL, Calderone A. (2003) AT₁ receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol* 138:1485-1494.
18. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. et al. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.

19. Pillarisetti K, Gupta SK. (2001) Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 25:293-300.
20. Pyo RT, Sui J, Dhume A, et al. (2006) CXCR4 modulates contractility in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41:834-844.
21. Qi M, Shannon TR, Euler DE, Bers DM, Samarel AM. (1997) Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 272:H2416-H2424.
22. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, et al. (2003) A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13513-13518.
23. Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. (2003) Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 108:2491-2497.
24. Segret A, Ricker-Martin C, Pavoine C, et al. (2007) Structural localization and expression of CXCL12 and CXCR4 in rat heart and isolated cardiac myocytes. *J Histochem Cytochem* 55:141-150.
25. Shepherd RM, Capoccia BJ, Devine SM, et al. Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD3100. *Blood* 108:3662-3667.
26. Suratt BT, Petty JM, Young SK, et al. (2004) Role of CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 104:565-571.
27. Tarzami ST, Miao W, Lopez L, Factor SM, Berman JW, Kitsis RN. (2003) Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. *Circulation* 108:2387-2392.

28. Ti TLY, Chen J, Bao W, et al. (2001) In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 104:2588-2594.
29. Wang Y, Ahmad N, Wani MA, Ashraf M. (2004) Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodelling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 37:1041-1052.
30. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. (2003) Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107:1322-1328.
31. Zarain-Herzberg A. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. (2006) *Can J Physiol Pharmacol* 84:509-521.
32. Zhang XQ, Tillotson DL, Moore RL et al. (1996) Na^{+} - Ca^{+} exchange currents and SR Ca^{2+} content in adult myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:H2079-H2088.

Table 1 Body and heart weights of sham and 1-week post-myocardial infarct (MI) rats and the effect of AMD3100

	BW (gram)	LV (mg)	LV/BW (mg/gram)	Septum (mg)	Septum/BW (mg/gram)	Scar Weight (mg)	Scar Surface Area (cm ²)
Sham (n=8)	328±8	550±37	1.69±0.11	189±15	0.59±0.03	--	
MI (n=10)	308±3 ^a	382±19 ^a	1.23±0.05 ^a	164±7	0.51±0.07	70±9	0.76±0.07
AMD3100+Sham (n=6)	320±4	513±20	1.64±0.08	164±7	0.48±0.03	--	
AMD3100+MI (n=9)	325±5 ^b	486±22 ^b	1.49±0.05 ^b	162±9	0.50±0.03	37±8 ^b	0.46±0.02 ^b

BW indicates body weight; and LV, left ventricle in sham rats and non-infarcted left ventricle in MI rats. Data are presented as mean±S.E.M, (a) represents p<0.05 versus sham, (b) p<0.05 versus MI, and (n) number of rats examined.

Table 2 Hemodynamic parameters of sham and 1-week post-myocardial infarct (MI) rats and the effect of AMD3100

	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	LV+dP/dt (mmHg/sec)	LV-dP/dt (mmHg/sec)
Sham (n=8)	118±5	139±8	10±1	6540±287	5249±207
MI (n=10)	99±5 ^a	109±5 ^a	18±2 ^a	5091±211 ^a	3771±173 ^a
AMD3100+Sham (n=6)	122±7	142±16	13±2	6243±372	4949±320
AMD3100+MI (n=7)	112±5 ^b	129±6	20±2 ^a	5869±235 ^b	4431±216 ^{a,b}

MAP indicates mean arterial pressure; LVSP, left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; +dP/dt, rate of contraction; -dP/dt, rate of relaxation. Data are presented as mean±S.E.M, (a) represents p<0.05 versus sham, (b) p<0.05 versus MI, and (n) number of rats examined.

Figure Legends

Figure 1. SDF-1 α mRNA expression in 1-week post-MI rats. SDF-1 α mRNA was significantly reduced in the NILV (n=8) as compared to the left ventricle (LV) of sham rats (n=5). Furthermore, SDF-1 α mRNA expression was detected in the infarct region (n=6) and was significantly greater than the NILV. (*) denotes p<0.05 versus sham and (**) denotes p<0.05 versus NILV.

Figure 2. SDF-1 α immunoreactivity in the infarct region. Figure 2A (Panel 1) SDF-1 α immunoreactivity was detected in the vasculature of numerous vessels of varying calibre in the infarct region (indicated by solid arrow). However, the intensity of SDF-1 α staining in scar-residing vessels was not uniform and in some cases immunoreactivity was absent (indicated by broken arrow). (Panel 2) Vascular smooth muscle cells stained positive for smooth muscle α -actin. (Panel 3) SDF-1 α immunoreactivity in the vasculature was co-incident with smooth muscle α -actin staining. (Panel 4) Phase contrast picture. Figure 2B (Panel 1) SDF-1 α immunoreactivity was detected in the vasculature and endothelium of a small calibre vessel (lumen diameter, 33 μ m). (Panel 2) Nestin immunoreactivity was detected in endothelial cells whereas staining of the surrounding vasculature was not observed. (Panel 3) SDF-1 α immunoreactivity in endothelial cells was co-incident with nestin staining. (Panel 4) Phase contrast picture. Figure 2C (Panel 1) Vessel (lumen diameter, 57 μ m) residing in the non-infarcted left ventricle did not stain for SDF-1 α . (Panel 2) Smooth muscle α -actin immunoreactivity was detected in vascular smooth muscle cells. (Panel 3) SDF-1 α immunoreactivity was not co-incident with smooth muscle α -actin staining. (Panel 4) Phase contrast picture.

Figure 3. Molecular remodeling of the non-infarcted left ventricle (NILV) in 1-week post-MI rats and the effect of AMD31000. (Panel A) SDF-1 α mRNA levels were significantly decreased in the left ventricle (LV) of AMD3100-treated (AMD) sham rats (n=5) and NILV of AMD3100-treated

post-MI rats (n=8). CXCR4 mRNA expression in the NILV of 1-week post-MI rats (n=8) was similar to sham (n=5). Furthermore, AMD3100 treatment of either sham (n=5) or post-MI rats (n=7) did not influence CXCR4 mRNA expression. (Panel B) ANP mRNA expression was increased in the NILV of 1-week post-MI rats (n=8), as compared to the LV of sham rats (n=5). Treatment of sham rats with AMD3100 (AMD; n=5) had no effect on ANP mRNA expression. In post-MI rats treated with AMD3100 (AMD; n=8), ANP mRNA expression in the NILV was significantly decreased as compared to untreated post-MI rats. (Panel C) SERCA2 mRNA expression was significantly decreased in the NILV of 1-week post-MI rats (n=8), as compared to the LV of sham rats (n=5). Treatment of sham rats with AMD3100 (AMD; n=5) had no effect on SERCA2 mRNA expression. In post-MI rats treated with AMD3100 (AMD; n=8), SERCA2 mRNA downregulation persisted. (Panel D) Collagen α_1 Type 3 mRNA expression was increased in the NILV of 1-week post-MI rats (n=8), as compared to the LV of sham rats (n=5). Treatment of sham rats with AMD3100 (AMD; n=5) had no effect on collagen α_1 Type 3 mRNA expression. In post-MI rats treated with AMD3100 (AMD; n=8), collagen α_1 Type 3 mRNA expression in the NILV remained elevated (n=7). (*) denotes $p < 0.05$ versus sham and (**) denotes $p < 0.05$ versus NILV.

Figure 4. Hypertrophic modulation of SDF-1 α reactivity and mRNA expression in neonatal rat ventricular myocytes.

(Panel A) The 24 hour exposure of neonatal rat ventricular myocytes to SDF-1 α failed to promote protein synthesis (open circles; n=4). The 24 hour exposure of ventricular myocytes to norepinephrine (NE; 1 μ M) promoted a hypertrophic phenotype (please see Results section). The subsequent treatment of hypertrophied cardiac myocytes with SDF-1 α significantly increased 3 H-leucine uptake (closed circles; n=4). (*) denotes $p < 0.05$ as assessed by a one way ANOVA. (Panel B) Norepinephrine (NE; 1 μ M)-treatment of ventricular myocytes (n=4) for 48 hours significantly increased 3 H-leucine uptake. The pre-treatment with

AMD3100 (AMD; 25 $\mu\text{g/ml}$) had no effect of NE-induced protein synthesis. By contrast, the increase in ^3H -leucine uptake promoted by SDF-1 α (SDF; 25 ng/ml) in hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes was abrogated by AMD3100 pre-treatment. (*) denotes $p < 0.05$ versus basal, and (**) denotes $p < 0.05$ versus NE+SDF-1 α . (Panel C) Norepinephrine (NE; 1 μM)-treatment of ventricular myocytes (n=4) for 24 hours significantly increased ANP and BNP mRNA levels and concomitantly reduced SDF-1 α mRNA expression. Data normalized to β -actin mRNA. (*) denotes $p < 0.05$ versus basal.

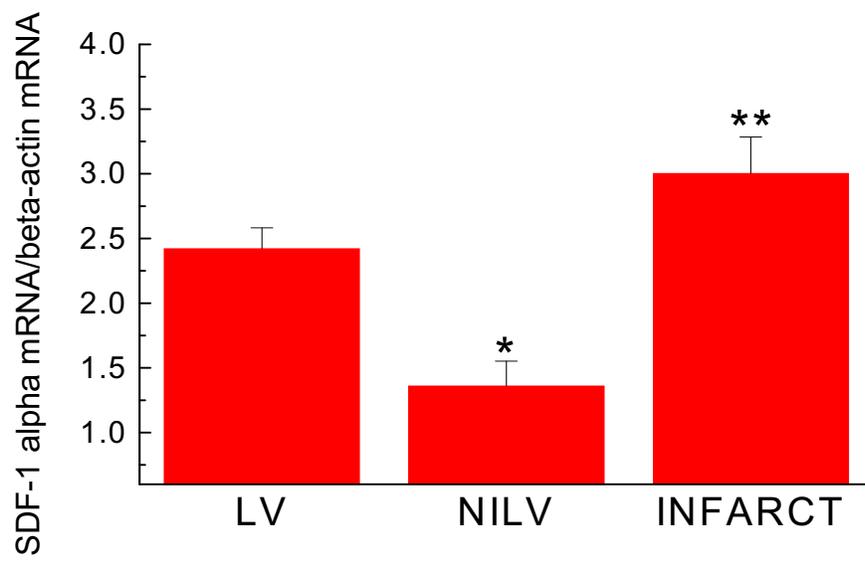
Figure 1

Figure 2A

A

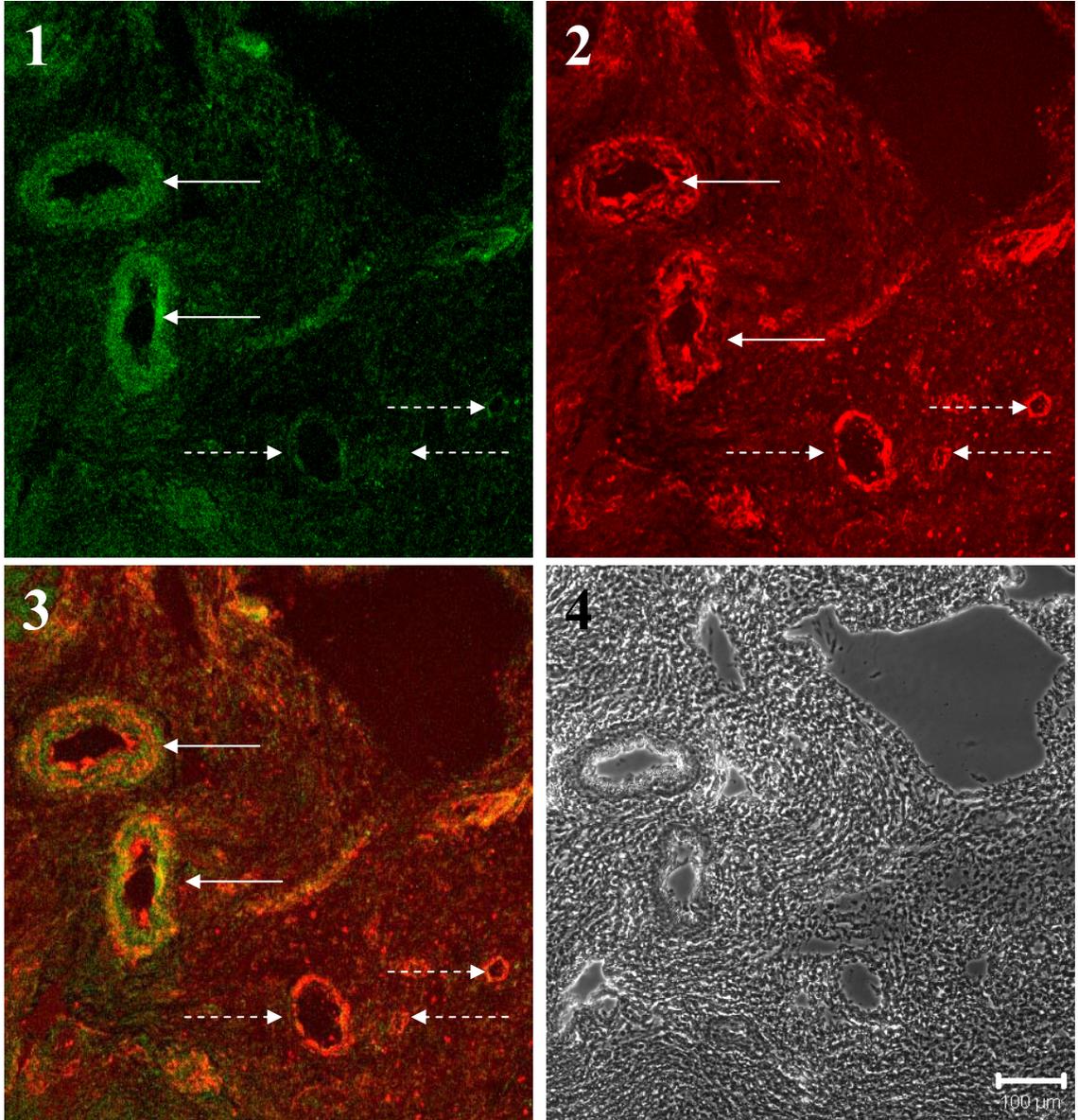


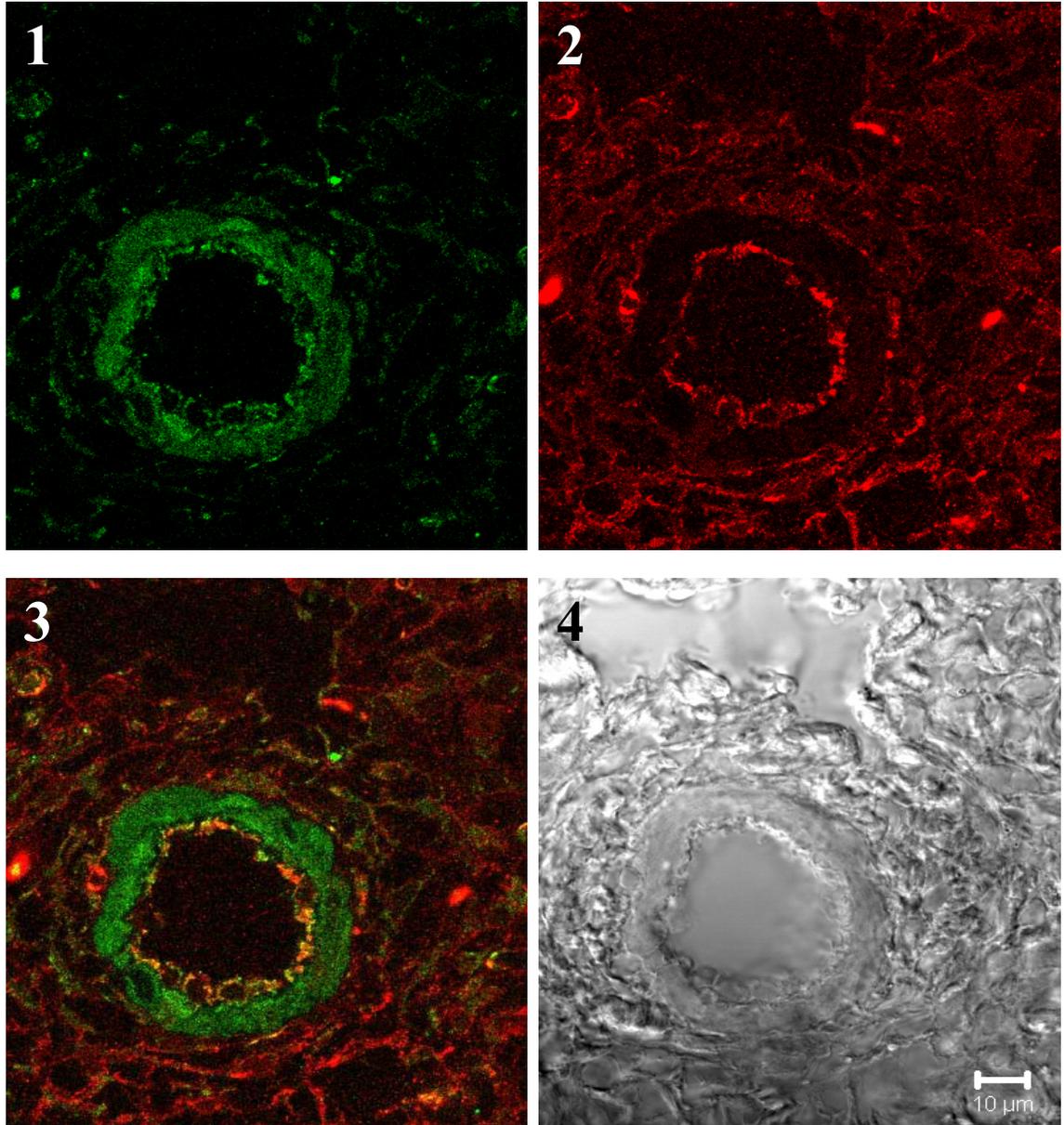
Figure 2B**B**

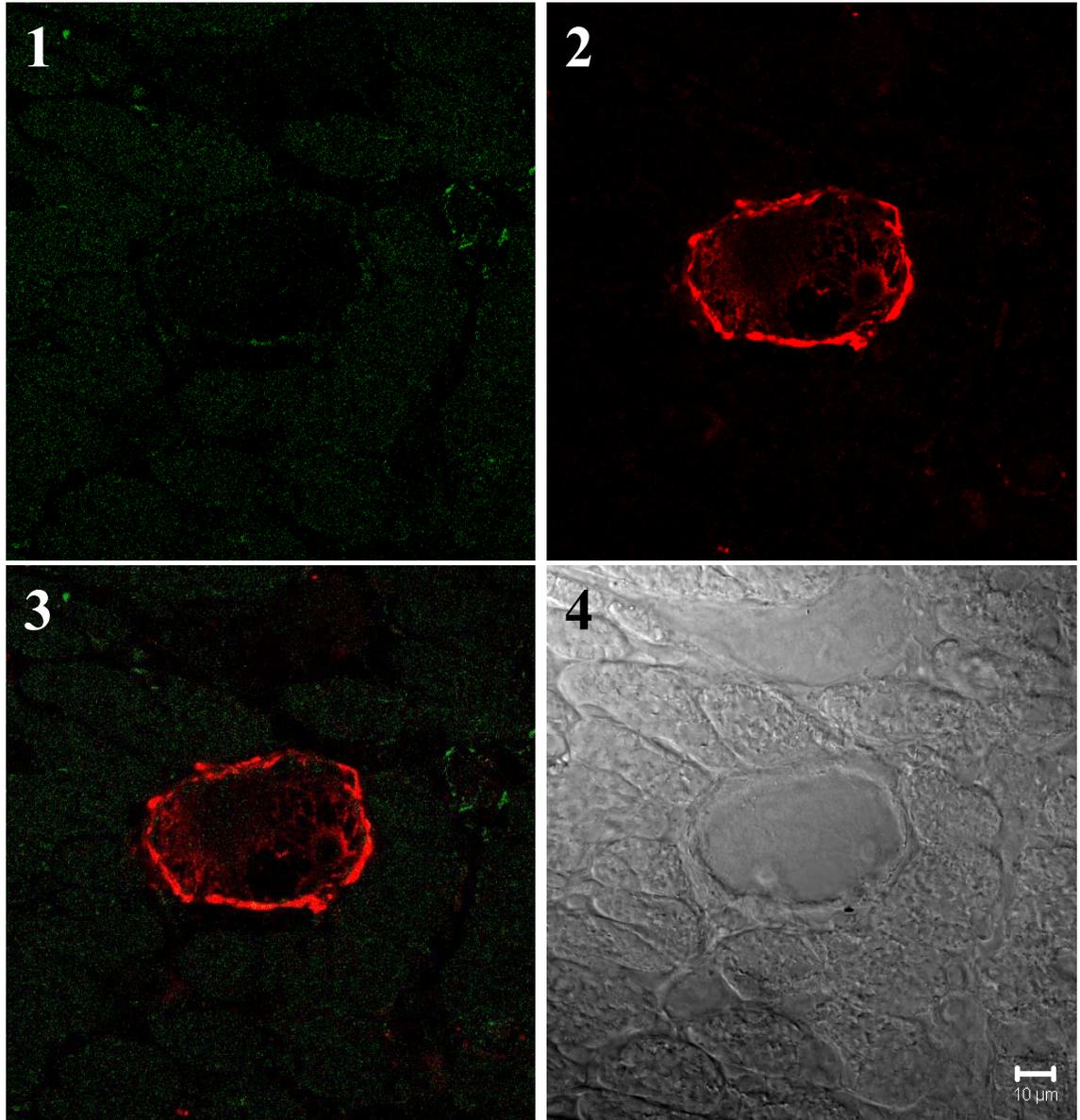
Figure 2C**C**

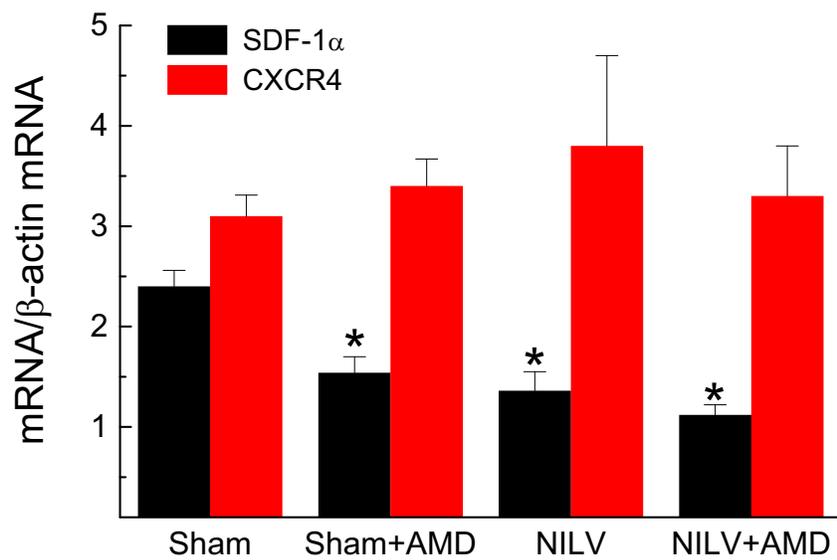
Figure 3A

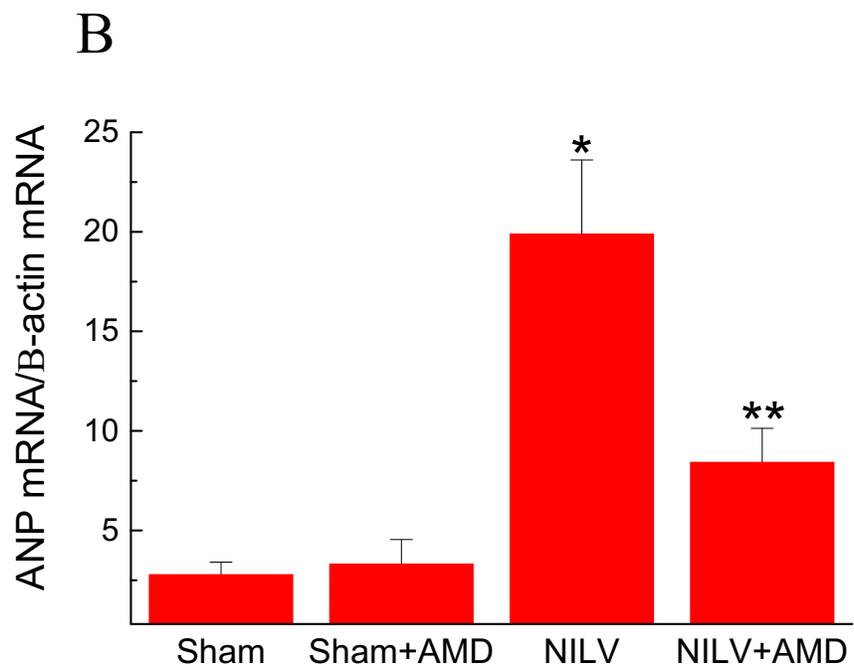
Figure 3B

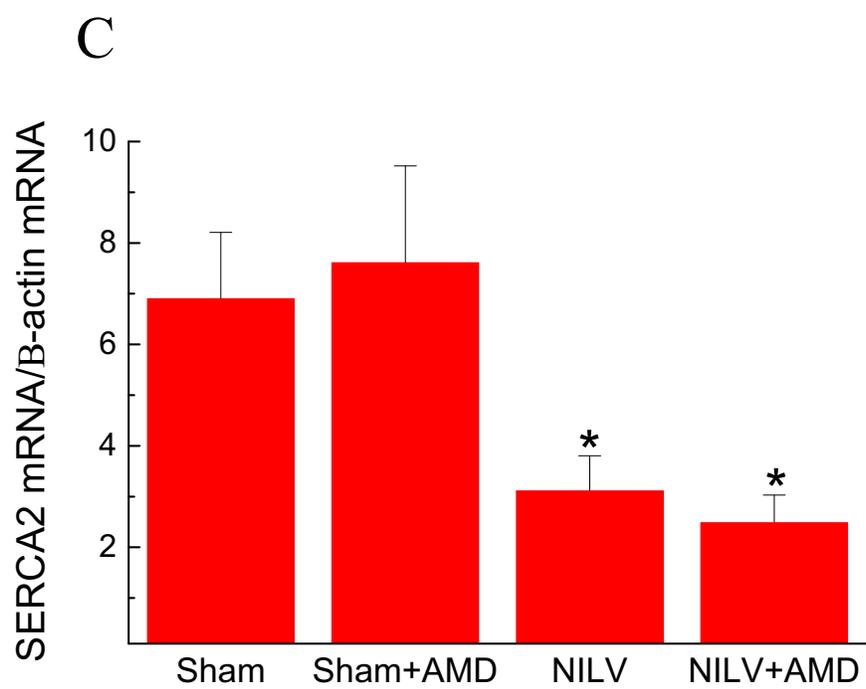
Figure 3C

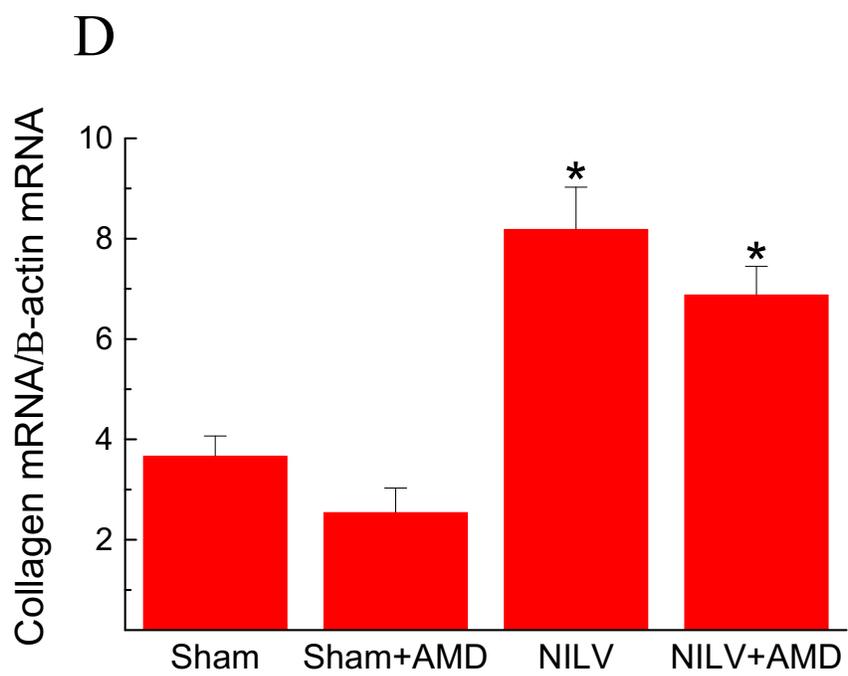
Figure 3D

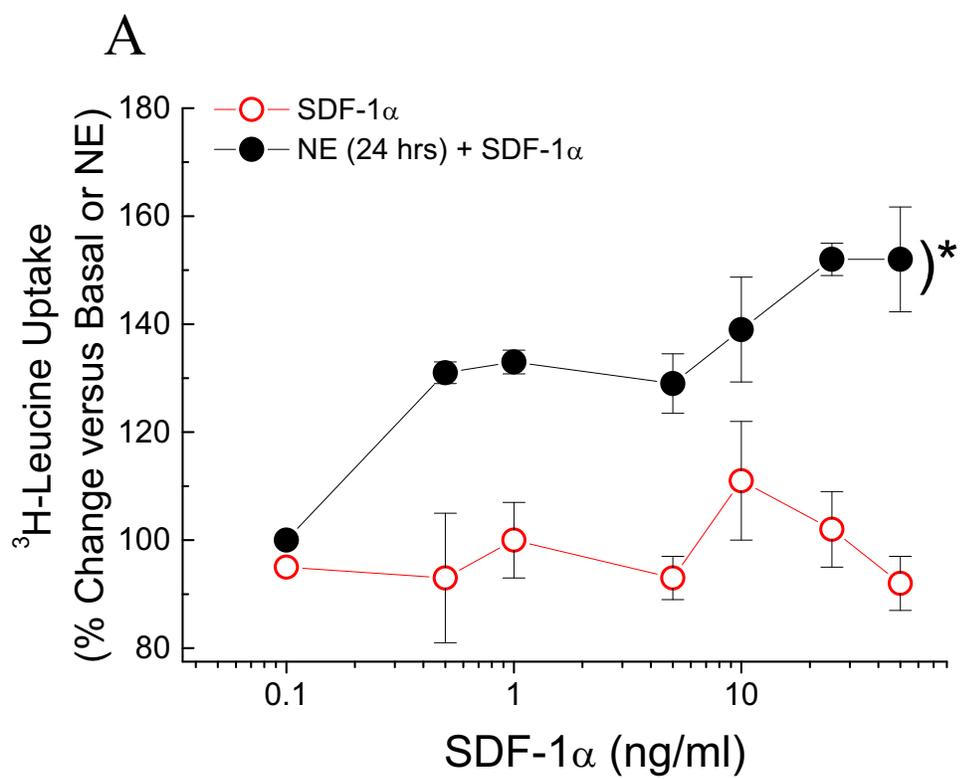
Figure 4A

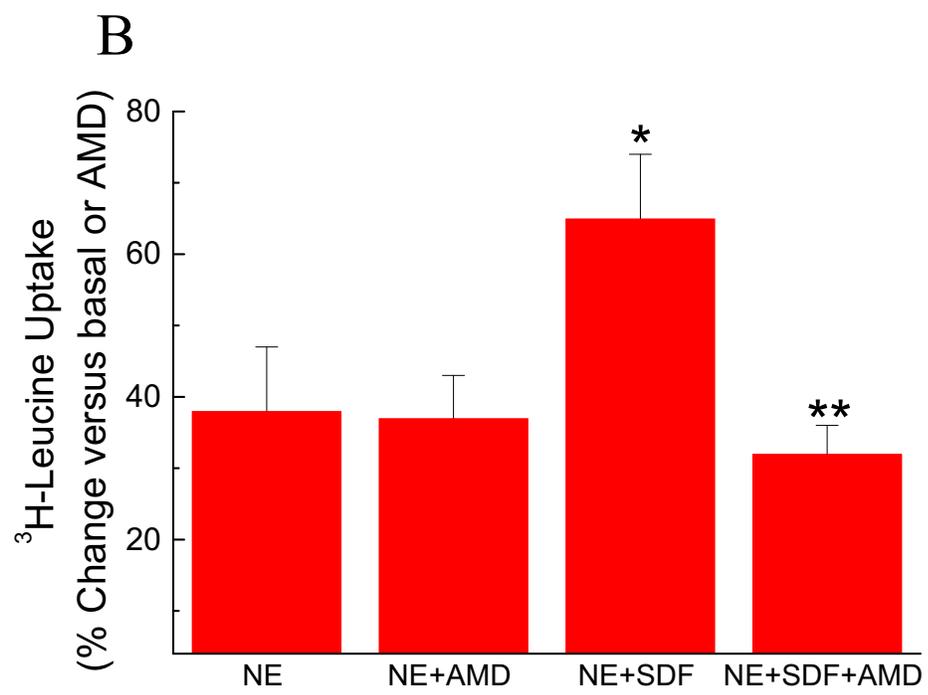
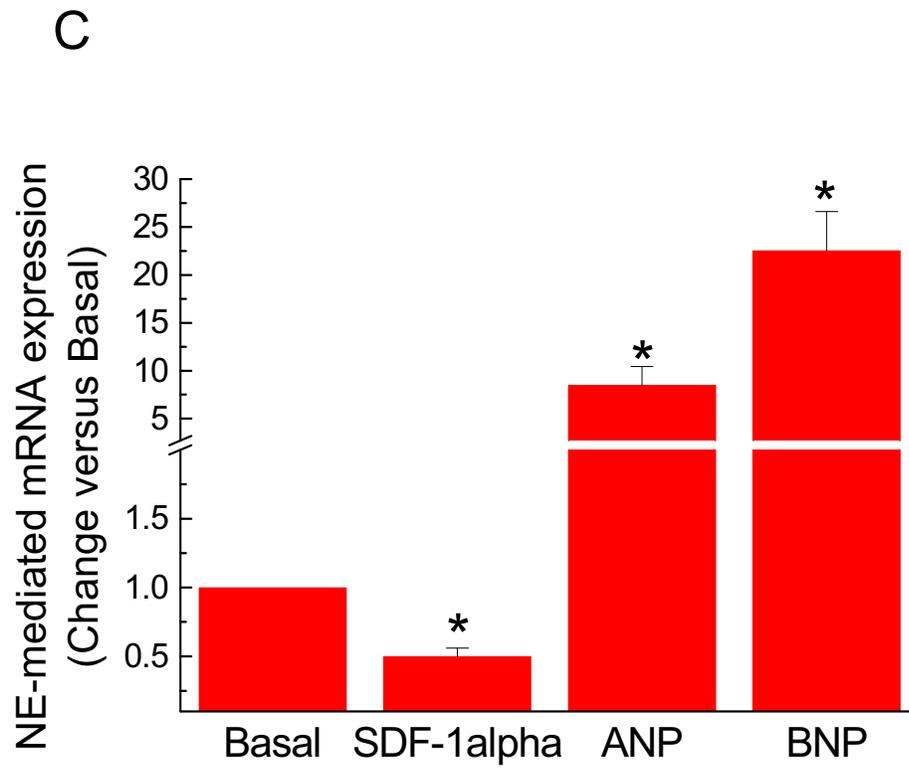
Figure 4B

Figure 4C

Résultats

La première partie de cette étude démontre que l'expression de l'ARNm du SDF-1 α dans le cœur de rat est augmentée à la suite d'un IM dans la région infarctée, particulièrement par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux. De plus, cette étude montre qu'un traitement de 6 jours avec de l'AMD3100, 24 heures après un IM, améliore significativement la fonction ventriculaire et diminue la taille de la cicatrice chez le rat. Il est aussi important d'ajouter que cette étude démontre que les cardiomyocytes hypertrophiés répondent plus au SDF-1 α que les cellules non hypertrophiées, suggérant un rôle adaptatif du cœur afin de mieux se réparer.

Ces résultats ont poussé le laboratoire à faire d'autres études sur l'effet d'un traitement avec de l'AMD3100. Ainsi, le même traitement, soit 1mg/kg d'AMD3100 a été administré à des souris afin de vérifier s'il y a une différence interspèce dans la réponse. Les souris ont reçu de l'AMD3100 de façon IP, puisque la dose d'AMD3100 est trop élevée pour être administrée dans leur nourriture considérant que les souris consomment moins que les rats. Quoique différente, cette voie d'administration a provoqué une diminution significative de la taille de la cicatrice ainsi qu'une amélioration concomitante de la fonction ventriculaire. De plus, cette deuxième partie de l'étude vise à préciser le mécanisme d'action potentiel qui entraîne la diminution de la taille de la cicatrice à la suite du blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4. Pour ce faire, l'infiltration leucocytaire ainsi que celle des neutrophiles ont été évaluées.

La deuxième partie de cette étude correspond à un complément à la suite de l'article et a pour but de préciser l'action d'un traitement avec de l'AMD3100 et de l'axe SDF-1 α /CXCR4 dans le remodelage cardiaque ventriculaire aigu.

4.1 Effet bénéfique «in vivo» de l'administration de 1mg/kg d'AMD3100 24 heures après l'infarctus du myocarde chez la souris

Le traitement avec de l'AMD3100 entraîne une diminution du poids ainsi que de la surface de la cicatrice tout en provoquant une amélioration de la fonction cardiaque chez le rat. Ainsi, le même traitement (1 mg/kg d'AMD3100, 24 heures après la ligature de l'artère coronaire, et ce, pour 6 jours) a été testé chez des souris afin de vérifier s'il existe des différences interespèces. Les souris ont reçu leur dose d'AMD3100 par voie IP. Telle qu'il a été observé chez les rats, à la suite du traitement avec de l'AMD3100, la surface de la cicatrice est significativement diminuée, ce qui coïncide avec une amélioration significative des pressions ventriculaires (Tableaux 4.1 et 4.2).

	PC (g)	Poids du cœur (g)	Taille de la cicatrice (% du VG)
Témoin (n=7)	29,0±0,8	0,158±0,009	0±0
IM (n=7)	28,0±0,4	0,156±0,004	29±2
Témoin+ AMD3100 (n=7)	28,0±1,0	0,148±0,004	0±0
IM+ AMD3100 (n=7)	26,0±0,8	0,150±0,005	19±3^a

TABLEAU 4.1 : Mesures du poids corporel, du poids du cœur de souris et de la taille de la cicatrice.

Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard à la moyenne. PC représente le poids corporel (a; p < 0.05 vs IM; statistiques effectuées par un « 2 way ANOVA » suivi d'un test post hoc Neuman-keuls).

	PAM (mmHg)	PSVG (mmHg)	PFDVG (mmHg)	+ dP/dt VG (mmHg/sec)	- dP/dt VG (mmHg/sec)
Témoin (n=7)	72±2	91±2	8±1	5000±140	4356±164
IM (n=7)	38±4^a	55±3^a	9±1	2429±202^a	1851±160^a
Témoin+ AMD3100 (n=7)	68±4	86±6	8±1	4937±173	4127±241
IM+ AMD3100 (n=7)	52±3^{a,b}	74±3^{a,b}	9±1	3784±303^{a,b}	3120±243^{a,b}

TABLEAU 4.2 : Mesures des pressions ventriculaires de souris.

Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard à la moyenne. PAM indique la pression artérielle moyenne; PSVG : la pression systolique du ventricule gauche; PFDVG : la pression ventriculaire gauche en fin de diastole; + dP/dt VG et - dP/dt VG: la dérivée première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (a; p < 0.05 vs témoin, b; p < 0.05 vs IM; statistiques effectuées par un « 2 way ANOVA » suivi d'un test post hoc Neuman-keuls).

4.2 Effets d'un traitement avec de l'AMD3100 sur l'infiltration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée chez la souris

Afin de préciser le mécanisme d'action qui provoque la diminution de la taille de la cicatrice et la concomitante amélioration de la fonction ventriculaire, l'infiltration leucocytaire a été évaluée. En plus, l'infiltration des neutrophiles plus particulièrement a été observée. Les études d'immunohistochimie ont démontré que, chez les souris IM non traitées avec de l'AMD3100, il y a une infiltration marquée de cellules inflammatoires et de neutrophiles dans la cicatrice une semaine après l'IM (FIG. 4,1; Tableau 4.3). Par contre, chez les souris IM traitées avec de l'AMD3100, l'infiltration leucocytaire ainsi que l'infiltration par les neutrophiles au niveau de la région infarctée sont pratiquement neutralisées (FIG. 4.2; Tableau 4.3). Ce résultat suggère que la diminution de la taille de la cicatrice et l'amélioration de la fonction ventriculaire pourraient, en partie, être dues à la diminution de l'infiltration des neutrophiles.

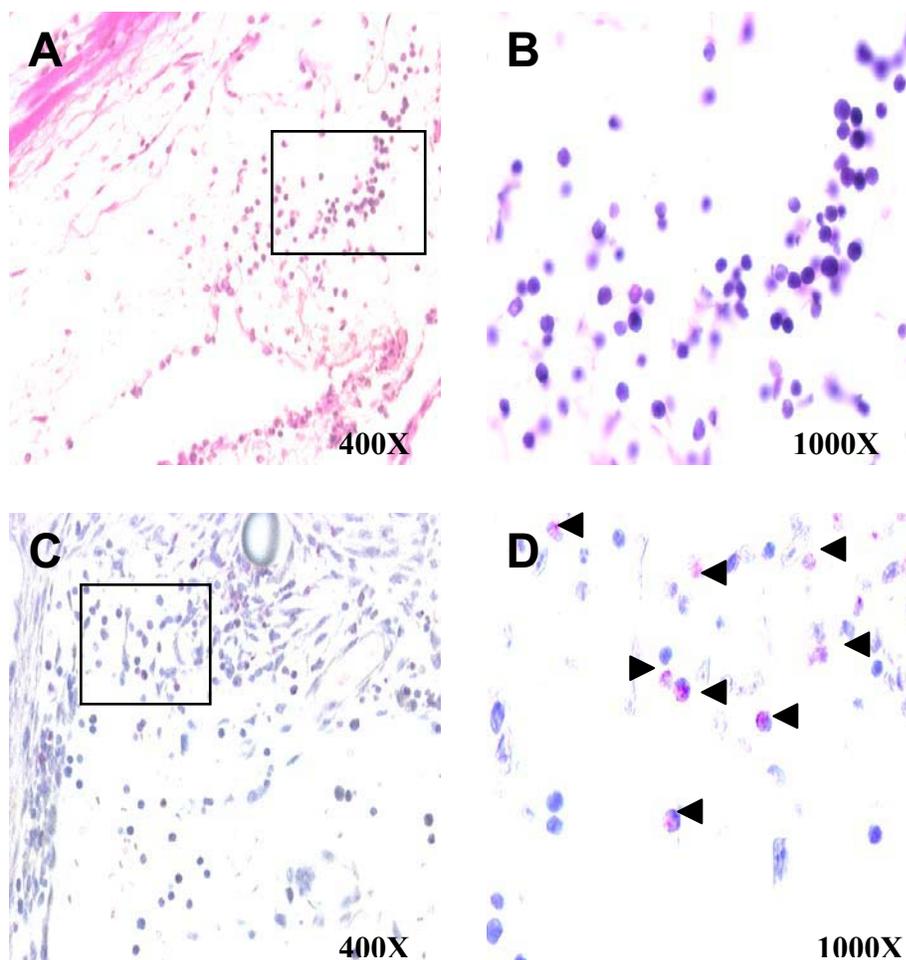


FIGURE 4.1: Infiltration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée de souris IM non traitées.

A : Dans le myocarde de souris une semaine après l'IM, une coloration HPS démontre une infiltration marquée de cellules de type leucocytaire dans la région infarctée. B : Cette photo représente un grossissement de la région encadrée en A. C : Une infiltration de neutrophiles est notée dans la région infarctée (coloration à l'estérase). La région encadrée dans la photo C est représentée à plus fort grossissement en D. Il est facile d'y distinguer la présence de neutrophiles marqués en rouge et représentés par les têtes de flèches dans la région infarctée (n=5).

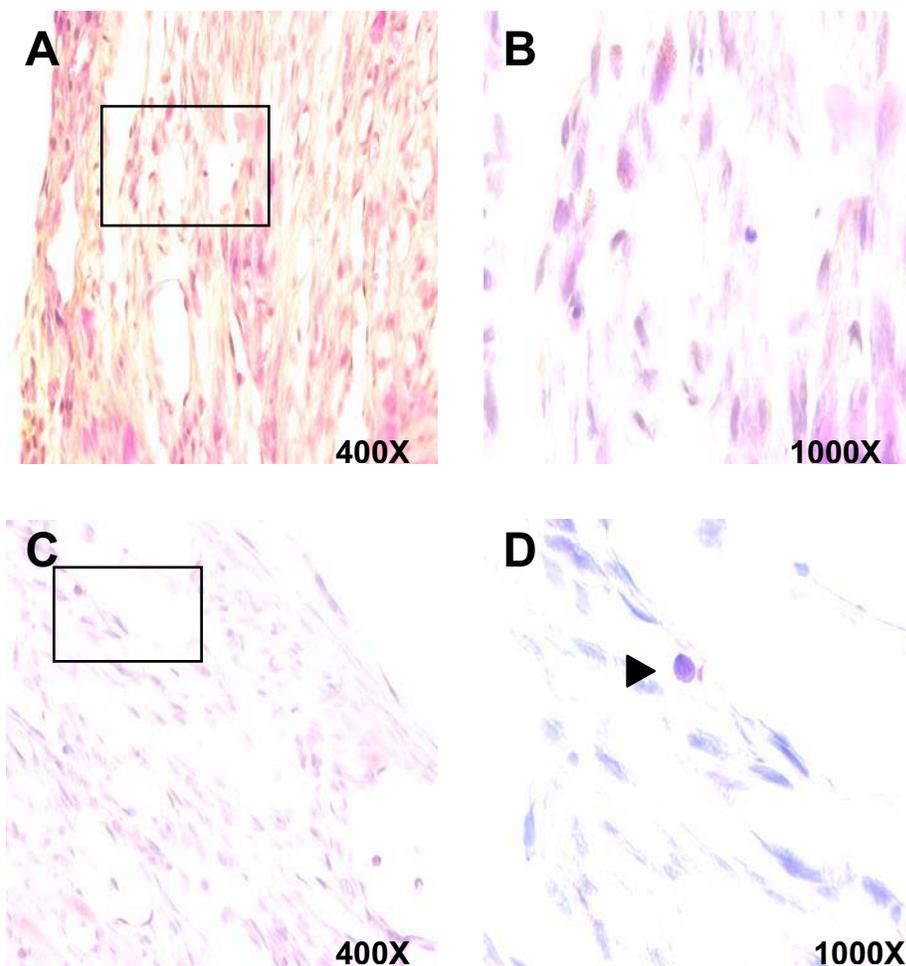


FIGURE 4.2 : Effet de l'AMD3100 sur la migration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée de souris.

A : Chez les souris traitées avec de l'AMD3100, la coloration HPS montre que l'infiltration des leucocytes dans la région infarctée est significativement réduite. B : La région encadrée en A est observée à plus fort grossissement. C : Chez les souris traitées avec de l'AMD3100, le nombre de neutrophiles (coloration à l'estérase) est significativement diminué dans la région infarctée. D : L'endroit encadré en C est représenté à plus fort grossissement. Cette figure démontre une infiltration limitée de la région infarctée par les neutrophiles qui sont marqués en violet et représentés par la tête de flèche (n=4).

	Souris IM (n=5)	Souris IM+AMD3100 (n=4)
Leucocytes	Échelle 3-4	Échelle 1
Neutrophiles	18 ± 5 cellules/mm ²	3 ± 1 cellules/mm ^{2a}

TABLEAU 4.3 : Effet de l'AMD3100 sur la migration des leucocytes et des neutrophiles dans la région infarctée de souris.

Le nombre de cellules leucocytaires a été évalué sur une échelle de 1 à 4 telle que décrite dans *Matériel et Méthodes*. Une diminution marquée de l'infiltration leucocytaire est observée une semaine après l'IM à la suite du traitement avec de l'AMD3100. Le nombre de neutrophiles a été comptabilisé et normalisé par rapport à la taille de la cicatrice tel qu'énoncé dans *Matériel et Méthodes* (a; $p < 0,05$ vs souris IM; statistiques effectuées par un test-T bilatéral non pairé de student).

Discussion

L'IM est une maladie commune chez la population vieillissante d'aujourd'hui. Il survient à la suite d'une ischémie myocardique provoquée par l'occlusion aiguë d'une artère coronaire, ce qui empêche la perfusion d'une région du cœur. L'ischémie entraîne la mort des cellules cardiaques de la région atteinte par apoptose et/ou par nécrose. À la suite de la mort cellulaire, un mécanisme adaptatif est déclenché activant la fibrose de réparation dans la région infarctée ainsi que la fibrose réactionnelle dans la région non infarctée du VG. Ces deux processus impliquent le dépôt de protéines de la MEC (majoritairement le collagène et la fibronectine). En parallèle, les cardiomyocytes situés dans le VGNI subissent une hypertrophie de type excentrique amenant la dilatation de la cavité ventriculaire. La région cicatricielle produit plusieurs facteurs conduisant à la migration de cellules inflammatoires et au développement d'une réponse inflammatoire. L'inflammation joue un rôle extrêmement important dans la reconstruction tissulaire. Grâce à l'IL-8 et au C5a, relâchés lors de l'ischémie, il y a recrutement de neutrophiles à la cicatrice. De plus, le MCP-1 induit la migration des monocytes. L'accumulation de cellules leucocytaires dans la région cicatricielle entraîne la sécrétion d'une grande quantité de facteurs de croissance. Ces derniers participent à la phagocytose des cellules mortes, à la synthèse des protéines de la MEC en plus d'augmenter l'infiltration de la région cicatricielle par les fibroblastes et d'y stimuler l'angiogenèse. Certaines chimiokines libérées lors de l'ischémie sont aussi connues pour conduire à la migration de cellules souches de la moelle osseuse qui participent à la réparation du tissu. À long terme, ces mécanismes compensatoires ne sont plus suffisants et il y a détérioration de la fonction ventriculaire menant à l'insuffisance cardiaque.

Plusieurs traitements sont utilisés pour améliorer la qualité de vie des gens qui survivent à l'IM. Les β -bloqueurs ainsi que les IECA en sont de bons exemples. Récemment, une nouvelle thérapie cellulaire a vu le jour (Scorsin et al, 1997). Elle consiste en l'injection de cellules souches provenant de la

moelle osseuse dans le cœur infarci. Il est établi que ces dernières peuvent se différencier en cellules cardiaques, comme des cardiomyocytes et des fibroblastes en plus d'améliorer la fonction ventriculaire (Hughes, 2002; Fishma et Anversa, 2002; Beltrami et al, 2003; Lee et Makkar, 2004; Fraidenraich et al, 2004; Perin et Silva, 2004).

Certains groupes se sont penchés sur l'optimisation de ce type de thérapie en tentant d'augmenter le recrutement des cellules souches vers la cicatrice (Orlic et al, 2001; Schober et al, 2003; Yamaguchi et al, 2003). Ces études montrent que la surexpression du SDF-1 α (une chimiokine avec des propriétés chimiotactiques), par l'injection d'adénovirus dans le mur ventriculaire immédiatement après la production de l'IM chez des souris, augmente la migration des cellules souches de la moelle osseuse (Abbott et al, 2004). De plus, l'injection de fibroblastes surexprimant le SDF-1 α dans les cœurs infarcis de rats depuis 8 semaines provoque le même effet (Askari et al, 2003). Il est important de noter que le SDF-1 α n'est certainement pas la seule chimiokine présente dans le cœur infarci. L'intérêt qui lui est porté dans la présente étude provient, entre autres, de la spécificité de la liaison de cette chimiokine à son récepteur, le CXCR4 (Gibejovà, 2000), de son rôle plus qu'important dans plusieurs maladies (cancer (Guleng et al, 2005), VIH (Crump et al, 1997), arthrite (De Klerck et al, 2005), etc.), de son implication au cours du développement (McGraft et al, 1999; Claps et al, 2005) et finalement, de son homologie interespèce qui est près de 99%. De plus, l'absence du SDF-1 α durant la période embryonnaire s'avère létale, ce qui suggère que cette chimiokine participe à plusieurs fonctions vitales lors du développement de l'organisme (Dealwis et al, 1998).

Le but de cette étude est donc de découvrir le rôle potentiel de la chimiokine SDF-1 α dans le remodelage cardiaque une semaine après un IM ainsi que son rôle direct sur les cellules cardiaques. Afin d'atteindre cet objectif, l'AMD3100, un antagoniste sélectif du CXCR4, a été administré à

des rats et des souris, 24 heures après la ligature de l'artère coronaire, sur une période de 6 jours.

5.1 Phénotype moléculaire du cœur après un infarctus du myocarde et régulation de l'expression du SDF-1 α

Chez le rat, l'occlusion complète de l'artère coronaire gauche entraîne un IM transmural du VG. L'hypertrophie du VGNI occasionnée par l'IM amène la réexpression de gènes foetaux tel que l'ANP. L'hypertrophie peut être évaluée de façon morphologique, par exemple avec l'augmentation du poids du cœur. À 7 jours, cette augmentation n'est cependant pas encore très évidente. L'hypertrophie peut aussi être évaluée au niveau moléculaire et cellulaire par l'induction de l'ARNm de l'ANP (Lee RT et al, 1988; Dexler et al, 1989; Calderone et al, 1995) et la diminution de l'expression de l'ARNm de SERCA2 (Zarain-Herzberg et al, 1996; Qi et al, 1997; Ahers et al, 2005). Ces événements sont décrits dans la littérature comme des événements associés à la réponse hypertrophique et sont induits à la suite de la ligature de l'artère, donc plus facile à observer après 7 jours d'occlusion. De plus, le remodelage du VGNI est associé à une réponse fibrotique qui consiste en la production de plusieurs types de collagène, dont le collagène α_1 Type 3 (Jirnar et Pelouch, 1993). Cette réponse fibrotique peut aussi être évaluée au niveau cellulaire et moléculaire par l'augmentation de l'expression de l'ARNm du collagène α_1 Type 3.

Afin de confirmer la réponse hypertrophique dans le VGNI chez des rats non traités avec de l'AMD3100, les ARNm de l'ANP et de SERCA2 ont été mesurés. La réponse fibrotique a été évaluée par l'ARNm du collagène α_1 Type 3. Dans cette étude, une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'ANP et du collagène α_1 Type 3 est observée et est associée à une diminution de SERCA2 (FIG. 3B, 3C et 3D). Ces résultats concordent avec une réponse hypertrophique et fibrotique dans le myocarde sain après un IM. Il est important de noter qu'après un IM, la fonction ventriculaire est

compromise comme en atteste la diminution des dP/dT positive et négative. Ceci résulte de la perte de cellules contractiles du VG. Ainsi, la fonction ventriculaire a aussi été évaluée et une baisse importante est observée chez tous les animaux IM (Tableau 2).

L'étape suivante correspond à évaluer l'expression de la chimiokine SDF-1 α , par la réaction en chaîne par polymérase en temps réel, dans le cœur de rats non traités une semaine après un IM. Plusieurs études démontrent que dans la phase aiguë du remodelage provoquée par un IM, il y a augmentation de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α . Malheureusement, ces études ne précisent pas si cette augmentation du SDF-1 α se produit dans la région cicatricielle ou dans le VGNI (Askari et al, 2003; Ma et al, 2005). Cependant, une étude de *Abbott et al* (2004) suggère que l'augmentation de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α pourrait se faire préférentiellement dans la région ischémique du cœur infarci. Afin de répondre à cette question, l'expression de l'ARNm du SDF-1 α a été évaluée dans les VGNI et les cicatrices de cœurs de rats.

À la suite d'un IM, l'expression de l'ARNm du SDF-1 α est significativement diminuée dans les VGNI. Cette diminution peut être secondaire à l'hypertrophie myocytaire. Pour confirmer cette hypothèse, des études sur des cardiomyocytes néonataux en culture ont été effectuées. En effet, les résultats démontrent que dans les cardiomyocytes néonataux hypertrophiés, l'expression de l'ARNm du SDF-1 α est considérablement diminuée (50%) (FIG. 4C). Dans la région cicatricielle, l'expression de l'ARNm du SDF-1 α est augmentée de façon importante par rapport au VGNI (FIG. 1). Ce profil d'expression de l'ARNm du SDF-1 α permet d'envisager la possibilité que dans le cœur infarci, il y a un gradient d'expression de la chimiokine SDF-1 α qui favoriserait la migration cellulaire vers la zone cicatricielle. Ainsi, la plus grande production du SDF-1 α dans cette région

permet un recrutement de cellules souches de la moelle osseuse ainsi que de cellules inflammatoires essentielles à un remodelage cardiaque adéquat.

Ainsi, les expériences précédentes permettent d'affirmer que le modèle d'IM utilisé est conforme aux standards requis (présence d'hypertrophie myocytaire et de fibrose) et que la chimiokine SDF-1 α est présente dans le cœur infarci, en particulier dans la cicatrice cardiaque. Ces résultats suggèrent la présence d'un gradient dans l'expression du SDF-1 α vers la cicatrice qui pourrait favoriser une migration cellulaire vers cette région.

5.2 Types cellulaires responsables de l'expression du SDF-1 alpha dans le cœur de rat adulte

Plusieurs recherches montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α pendant la phase aiguë du remodelage ventriculaire après l'occlusion de l'artère coronaire (Askari et al, 2003; Abbot et al, 2004; Ma et al, 2005). *Abbott et al* (2004) ont démontré qu'à 24 heures et 72 heures après un IM, les vaisseaux ainsi que les cardiomyocytes de la région bordant l'IM et de la région infarctée avaient la capacité de produire le SDF-1 α . Peu d'études se sont intéressées à identifier quels types cellulaires participent à la production de SDF-1 α 7 jours après un IM. Des études d'immunofluorescence sur des coupes de cœur de rats adultes une semaine après l'IM ont donc été effectuées pour déterminer le profil d'expression de la protéine du SDF-1 α dans les cellules du cœur, 7 jours après l'IM. Les résultats suggèrent que la synthèse et la sécrétion du SDF-1 α proviennent majoritairement de deux types cellulaires; les cellules du muscle lisse (FIG. 2A) et les cellules endothéliales (FIG. 2B) des vaisseaux de différents calibres (20-200 μ m de diamètre) de la région cicatricielle et en bordure de cette dernière. Ceci confirme les résultats obtenus par le groupe d'*Abbott et al* (Abbott et al, 2004). Par contre, dans le VGNI, les vaisseaux n'étaient pas positifs pour le SDF-1 α (FIG. 2C). Ce qui vient confirmer les résultats montrés dans la figure 1 où il y a un gradient d'expression du SDF-1 α vers la cicatrice. De plus, ceci suggère fortement que l'augmentation de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α dans le cœur infarcté provient exclusivement des vaisseaux de la région cicatricielle. Cela peut expliquer l'effet chimiotaxique de la chimiokine sur le recrutement des cellules souches de la moelle osseuse vers la cicatrice précisément.

5.3 Effet bénéfique «in vivo» de l'administration de 1mg/kg de l'AMD3100 24 heures après l'infarctus

Un des rôles principaux du SDF-1 α dans les tissus ischémiques implique la migration de cellules souches de la moelle osseuse ainsi que de cellules inflammatoires à l'endroit de la lésion (Askari et al, 2003; Schober et al, 2003; Abbott et al, 2004; Kucia et al, 2004; Misao et al, 2006). Cependant, plusieurs études suggèrent que la chimiokine pourrait avoir un rôle sur le remodelage cardiaque par un autre mécanisme que son effet chimiotaxique sur les cellules souches et inflammatoires (Hoffmeyer et al, 2000; De Klerck et al, 2005). Les résultats précédents démontrent que dans la cicatrice, 7 jours après un IM, le SDF-1 α est produit par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux. La prochaine étape consiste à évaluer le rôle de l'axe SDF-1 α /CXCR4 chez un animal ayant subi un IM. Afin de déterminer le rôle local du SDF-1 α pendant la phase aiguë de la cicatrisation, l'antagoniste sélectif du CXCR4, l'AMD3100, a été administré à raison de 1 mg/kg dans la nourriture de rat, 24 heures après l'IM, pendant 6 jours. En ce qui concerne les souris, elles ont reçu la même concentration d'AMD3100, par une voie d'administration différente, soit en IP.

Le traitement avec de l'AMD3100 n'a pas affecté le poids ni la fonction ventriculaire des animaux témoins (rats et souris). À la suite du traitement avec de l'AMD3100, une diminution significative de la taille et du poids de la cicatrice a été observée par rapport aux animaux non traités chez les deux espèces (Tableau 1; Tableau 4.1). Chez le rat, cette diminution de la taille de la cicatrice est associée à une augmentation du poids du VG (LV dans le Tableau 1) et du ratio VG/PC (LV/BW dans le Tableau 1) comparativement aux animaux non traités. Chez les rats et les souris traités avec de l'AMD3100, la diminution de la taille de la cicatrice concorde avec

l'amélioration de la fonction ventriculaire et l'amélioration de la PAM (MAP dans le Tableau 2) (Tableau 2; Tableau 4.2). L'amélioration de la fonction ventriculaire à la suite du traitement avec de l'AMD3100 peut aussi être due au blocage de l'effet inotropique négatif associé au SDF-1 α . En effet, une étude menée par *Pyo et al* (2006) a démontré que le SDF-1 α , en se liant à son récepteur, le CXCR4, inhibe la contraction myocytaire. Cette amélioration de la fonction ventriculaire à la suite du traitement à l'AMD3100 peut donc être liée à l'action inotropique négative du SDF-1 α .

Il est à noter que la PFDVG (LVEDP dans le tableau 2) est restée élevée et il y a toujours une réduction du $-dP/dT$ à la suite du traitement avec de l'AMD3100 chez les deux espèces étudiées (Tableau 2; Tableau 4.2). En plus des changements morphologiques du cœur après un IM, il y a des changements aux niveaux cellulaire et moléculaire qui peuvent aussi influencer la PFDVG. Ce résultat suggère donc un problème dans le mécanisme de relaxation myocytaire. Premièrement, il est bien connu que SERCA2 joue un rôle important dans la recapture du calcium intracellulaire et donc, dans la relaxation myocytaire. Il a aussi été démontré que 3 semaines après un IM, l'ARNm de SERCA2 était diminué dans les cardiomyocytes isolés (Qi et al, 1997; Ahlers et al, 2005; Zarain-Herzberg et al 2006). À la suite du traitement avec de l'AMD3100, la diminution de l'ARNm de SERCA2 persiste et pourrait être un des mécanismes responsables de la dysfonction au niveau de la relaxation myocytaire. Une preuve plus directe aurait certainement été de mesurer la protéine de SERCA2. Malheureusement, cette expérience n'a pas été effectuée dans la présente étude. Deuxièmement, la fibrose réactionnelle du VGNI, mise en évidence par l'augmentation de l'ARNm du collagène $\alpha 1$ Type 3 n'est pas abolie par le traitement avec de l'AMD3100 (FIG. 3D). Ainsi, il est possible que la fibrose puisse influencer la PFDVG en empêchant une bonne relaxation myocytaire. En troisième lieu, il serait aussi possible que ce défaut dans la relaxation myocytaire soit due à un dérèglement ou un défaut d'expression de

phospholamban (protéine diminuant l'activité de SERCA2) ou de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ à la membrane plasmique (échangeur qui participe à la sortie des ions calciques du cardiomyocyte) (Zhang et al, 1996; Qi et al, 1997; Zarain-Herzberg et al, 2006). Cependant, ce dernier aspect n'a pas été vérifié dans la présente étude.

En ce qui concerne les souris, il est important de dire que tous les cœurs utilisés avaient une bonne cicatrice visible et que la PAM, la PSVG ainsi que la dP/dT positive et négative ont été diminués à la suite de la ligature de l'artère coronaire. Ces résultats confirment le fait que les cœurs avaient bel et bien subi un IM. Au tableau 4.2, il n'y a pas d'augmentation de la PFDVG chez les souris IM et IM+AMD3100, ce qui ne s'accorde pas avec les données indiquant une réduction de la fonction ventriculaire. En effet, le laboratoire du *Dr Calderone* a bien démontré que chez les rats IM, la PFDVG augmente de façon statistiquement significative et est associée avec une diminution de la PSVG et de la dP/dt positive et négative. La présente étude est la première effectuée par le laboratoire du *Dr Calderone* chez les souris. Malgré la diminution de la PAM, de la PSVG et des dP/dT, qui supportent la présence d'un IM important, il n'y a pas d'augmentation significative de la PFDVG. Une raison pouvant expliquer ce phénomène est que les mesures à l'aide du cathéter Millar ne soit pas aussi sensible pour détecter des changements de la PFDVG chez les souris une semaine après un IM.

Ce travail est le premier à montrer que le bloqueur du récepteur CXCR4, l'AMD3100, diminue la taille de la cicatrice. En effet, le fait de bloquer les effets du SDF-1 α permet une diminution de la taille de la cicatrice ainsi qu'une amélioration de la fonction ventriculaire chez les deux espèces étudiées. De plus, ces résultats suggèrent que l'augmentation du SDF-1 α , préférentiellement dans la cicatrice, peut contribuer à son expansion. Deux hypothèses peuvent expliquer la diminution de la taille cicatrice. Il pourrait y

avoir une mobilisation de cellules souches de la moelle osseuse ou encore une atténuation de la réponse inflammatoire.

En ce qui concerne la première hypothèse, il est connu l'axe SDF-1 α /CXCR4 est fonctionnel dans la moelle osseuse et permet d'y maintenir les cellules souches dans les niches. Plusieurs études ont montré qu'à la suite du traitement avec de l'AMD3100, il y a libération massive de cellules souches (hématopoïétiques et cellules progénitrices endothéliales) de la moelle osseuse vers la périphérie. Ces cellules peuvent participer à la formation des nouveaux vaisseaux dans la région ischémique du cœur (Askari et al, 2003; Liles et al, 2003; Abbot et al, 2004; Broxmeyer et al, 2005; Burroughs et al, 2005; De Clercq, 2005; Flomenberg et al, 2005; Liles et al, 2005; Larochelle et al, 2006; Martin et al, 2006). À la suite d'un dommage comme un IM, il y a une augmentation de la production du SDF-1 α dans le cœur. Ce gradient du SDF-1 α créé dans la région infarctée permet le recrutement des cellules souches de la moelle osseuse vers le cœur (Ratajczak et al, 2004). Lorsque l'axe SDF-1 α /CXCR4 est bloqué par de l'AMD3100, les cellules souches sont libérées dans le sang en très grand nombre et leur migration au site de l'IM peut se produire grâce à la présence d'autres chimiokines comme 6-Ckine, MCP-1, IL-6, IL-8, SCF, etc. Ces chimiokines peuvent entraîner la migration de cellules et compenser le manque du SDF-1 α . Selon cette hypothèse, l'augmentation du nombre de cellules souches de la moelle osseuse en circulation amène un remodelage ventriculaire plus efficace, résultant en l'apparition de plusieurs effets bénéfiques. Il aurait été possible de vérifier cette hypothèse en effectuant des études avec des rats irradiés, transplantés avec une moelle osseuse positive à la protéine fluorescente verte (GFP positive) et ayant subi un IM. La différence dans la migration des cellules souches des animaux traités et non traités avec de l'AMD3100 aurait été détectée par le marquage GFP positif dans la cicatrice cardiaque. De cette façon, l'effet du traitement avec de

l'AMD3100 sur la migration des cellules souches de la moelle osseuse aurait pu être directement étudié.

Pour la deuxième hypothèse, soit l'atténuation de la réponse inflammatoire, il est bien connu que le SDF-1 α entraîne la migration vers les tissus endommagés de plusieurs types de cellules inflammatoires (monocytes, lymphocytes T...), plus particulièrement des neutrophiles (Suratt et al, 2004). Ces derniers peuvent avoir un rôle néfaste lors de l'IM en endommageant la vasculature ainsi que les cardiomyocytes par la formation de radicaux libres (Lucchesi, 1994; Hoffmeyer et al, 2000; TI et al, 2001; Tarzami et al, 2003). Ainsi, le blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4, en plus de libérer les neutrophiles de la moelle osseuse, pourrait diminuer le recrutement de ces cellules à la cicatrice et ainsi atténuer les effets néfastes pouvant être causés par les neutrophiles durant la phase aiguë du remodelage ventriculaire.

5.4 Effets d'un traitement avec de l'AMD3100 sur l'infiltration leucocytaire dans la région infarctée

Afin de tester l'hypothèse attestant que le traitement avec de l'AMD3100 atténuait la réponse inflammatoire en diminuant le recrutement de neutrophiles à la cicatrice, des études ont été faites chez la souris. Une coloration HPS a été utilisée afin d'étudier l'infiltration des cellules inflammatoires tandis qu'une coloration à l'estérase a permis d'identifier spécifiquement les neutrophiles. Chez les souris IM non traitées avec de l'AMD3100, il y a une forte infiltration leucocytaire et neutrophilaire dans la cicatrice cardiaque (FIG. 4.1 ; Tableau 4.3). Par contre, à la suite du traitement avec de l'AMD3100, la migration, autant des cellules inflammatoires en général que des neutrophiles en particulier, a diminué de façon statistiquement significative (FIG. 4.2; Tableau 4.3). Une étude menée par le groupe de *De Klerck* (2005) démontre aussi une diminution de l'infiltration des neutrophiles et des leucocytes dans un modèle murin d'arthrite à la suite du blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4. La diminution de la migration des neutrophiles à la région infarctée est liée au blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4 par de l'AMD3100, mais elle pourrait aussi être liée à la diminution de la taille de la cicatrice (une plus petite cicatrice produit moins de facteurs chimiotaxiques, ce qui diminue l'infiltration par les cellules inflammatoires).

La réduction de l'infiltration leucocytaire pourrait expliquer la diminution de la taille de la cicatrice cardiaque après un traitement avec de l'AMD3100. Le SDF-1 α est une chimiokine libérée très tôt après l'apparition de l'IM et les neutrophiles font partie des premières cellules inflammatoires à envahir la région cicatricielle. Ce n'est que vers la deuxième journée après l'IM que les autres cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes) pénètrent dans

la région infarctée (Yang et al, 2002). Dans un site lésionnel, tel un IM, le rôle des neutrophiles est de débarrasser l'organisme des cellules mortes et des débris produits lors de l'ischémie. Pour ce faire, les neutrophiles procèdent à la phagocytose des cellules détruites. Lors de ce processus, une grande quantité de radicaux libres est rejetée dans le milieu extracellulaire, ce qui contribue à la destruction du tissu sain entourant la lésion et par le fait même, contribue à l'expansion de cette dernière. À ce stade du remodelage cicatriciel, le blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4 empêche les neutrophiles, donc la majorité des cellules inflammatoires activent à ce moment, d'atteindre la cicatrice. Ainsi, la réduction de l'infiltration des neutrophiles pourrait expliquer la diminution de la taille de la cicatrice et les effets bénéfiques d'un traitement avec de l'AMD3100 24 heures après l'IM.

5.5 Effets d'un traitement avec de l'AMD3100 sur l'expression des gènes dans le cœur de rat adulte et effet biologique du SDF-1 alpha et de l'AMD3100 sur la croissance des cellules cardiaques «in vitro»

Afin d'approfondir le mécanisme d'action par lequel le blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4 provoque une diminution de la taille de la cicatrice ainsi qu'une amélioration de la fonction ventriculaire, l'effet du traitement avec de l'AMD3100 a été étudié sur les facteurs majeurs du remodelage ventriculaire, soient l'hypertrophie (par l'expression de l'ARNm de l'ANP et de l'ARNm de SERCA2) et la fibrose (par l'expression de l'ARNm du collagène α_1 Type 3). Chez les animaux témoins, l'AMD3100 n'affecte pas l'expression basale de l'ARNm de l'ANP, de SERCA2 ni du collagène α_1 Type 3 dans le VG (FIG. 3B, 3C et 3D). Par contre, administré à des rats après l'IM, l'AMD3100 diminue significativement l'expression de l'ARNm de l'ANP comparativement aux animaux IM. Cependant, l'expression de l'ARNm de l'ANP reste toujours significativement élevée comparativement aux animaux témoins (FIG. 3B), ce qui suggère qu'une réponse hypertrophique est maintenue.

Deux hypothèses sont envisageables afin d'expliquer cette diminution. D'abord, la diminution de la taille de la cicatrice suivant le traitement à l'AMD3100 engendre une réduction de la mort cellulaire. Par conséquent, ceci entraîne une suppression partielle de l'expression des gènes foetaux comme l'ARNm de l'ANP au niveau du VGNI. En parallèle, l'IM provoque toujours une certaine surcharge volumique permettant le maintien d'une hypertrophie myocytaire, mais atténuée comparée aux animaux IM non traités. Un deuxième mécanisme pourrait être un effet direct du SDF-1 α sur les cardiomyocytes, ce qui stimulerait l'expression de l'ARNm de l'ANP. Si la deuxième explication est vraie, le traitement avec de l'AMD3100 devrait

bloquer l'effet de la stimulation du SDF-1 α sur l'expression de l'ARNm de l'ANP et produire la diminution observée. En effet, cette hypothèse a été testée *in vitro*, car les études *in vivo* ne permettent pas de déterminer si le SDF-1 α peut avoir un rôle direct sur les cellules cardiaques. Pour vérifier cette hypothèse, l'effet du SDF-1 α sur les cardiomyocytes ventriculaires provenant de rats néonataux a été analysé. Les cellules cardiaques néonatales représentent un excellent modèle qui récapitule les événements cellulaires et moléculaires qui se déroulent dans un animal soumis à une surcharge hémodynamique (Molkentin et al, 1998; Calderone et al, 2000).

L'effet du SDF-1 α sur la synthèse protéique des cardiomyocytes néonataux a été testé en utilisant l'incorporation de la leucine marquée ([H³]-leucine) dans les nouvelles protéines formées. Ceci représente un indice de la synthèse protéique effectuée par les cellules. À la suite du traitement avec le SDF-1 α des cardiomyocytes néonataux, la synthèse protéique n'est pas affectée (FIG. 4A). Par contre, il est bien établi que dans l'IM, les cardiomyocytes subissent une hypertrophie. Alors, les cardiomyocytes néonataux ont été hypertrophiés par un prétraitement à la NA (Simpson, 1983). Les cardiomyocytes hypertrophiés sont plus grands, les filaments d'actine sarcomérique y sont organisés et la synthèse protéique est augmentée comparés aux cardiomyocytes non hypertrophiés (Simpson, 1985). Les cellules ont ensuite été exposées aux mêmes concentrations de SDF-1 α et les études de croissance utilisant l'incorporation de la leucine tritiée ont été reproduites. Les résultats montrent que dans les cardiomyocytes néonataux hypertrophiés, la synthèse protéique stimulée par SDF-1 α augmente significativement comparée aux cardiomyocytes non hypertrophiés (FIG. 4A). Ces résultats suggèrent que seuls les cardiomyocytes hypertrophiés répondent à une stimulation au SDF-1 α en augmentant leur synthèse protéique. Ceci évoque la probabilité qu'à la suite de l'hypertrophie, les cardiomyocytes subissent un changement de phénotype leur permettant de répondre à la stimulation au SDF-1 α . Cette

augmentation dans la réponse des cardiomyocytes hypertrophiés peut être due à une translocation plus grande des récepteurs CXCR4 à la membrane augmentant l'interaction avec le SDF-1 α , ce qui provoque une réponse plus prononcée. Cette hypothèse a été vérifiée et aucune différence dans l'expression protéique du CXCR4 n'a pu être observée (résultats non montrés).

Lorsqu'ils sont hypertrophiés, les cardiomyocytes répondent par une synthèse accrue de protéines après une stimulation avec le SDF-1 α . L'AMD3100, comme il a été démontré, diminue la réponse hypertrophique au niveau du VGNI en plus de diminuer l'expression du SDF-1 α dans les VG de rats témoins. Ces résultats ont conduit à l'étude de l'effet d'un traitement avec de l'AMD3100 sur les cardiomyocytes hypertrophiés. En effet, l'hypertrophie des cardiomyocytes néonataux occasionne un changement phénotypique des cellules. Le traitement avec de l'AMD3100 n'a pas affecté l'incorporation de la [H³]-leucine dans les cellules hypertrophiées. Comme prévu, la stimulation des cardiomyocytes hypertrophiés avec 25 ng/mL du SDF-1 α entraîne une augmentation significative de la synthèse protéique. Par contre, l'administration concomitante de l'AMD3100 et du SDF-1 α aux cardiomyocytes néonataux hypertrophiés inhibe complètement l'augmentation de l'incorporation de la [H³]-leucine, donc une inhibition de la synthèse protéique (FIG. 4B). Ceci vient confirmer que l'AMD3100 est un antagoniste sélectif du CXCR4, puisque son administration vient contrecarrer l'effet du SDF-1 α sur les cardiomyocytes hypertrophiés. Cette étude est la première à démontrer que l'axe SDF-1 α /CXCR4 contribue à la croissance hypertrophique, *in vitro*, de cardiomyocytes ventriculaires néonataux. Ainsi, l'étude *in vitro* suggère indirectement que l'atténuation partielle de la réponse hypertrophique du VGNI à la suite du traitement avec de l'AMD3100 peut être, en partie, liée au blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4.

L'effet du traitement avec de l'AMD3100 sur la fibrose a aussi été évalué en mesurant l'expression de l'ARNm du collagène α_1 Type 3. Le traitement avec de l'AMD3100 n'a pas affecté le niveau d'expression du collagène α_1 Type 3 (FIG. 3D). Ces résultats suggèrent que la fibrose n'est pas touchée par le blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4 à l'aide de l'AMD3100. Ceci évoque la probabilité que le SDF-1 α ne joue pas un rôle majeur dans la réponse fibrotique des fibroblastes cardiaques.

Finalement, l'effet du traitement avec de l'AMD3100 sur l'expression de l'ARNm du SDF-1 α et du CXCR4 dans les VG ainsi que dans les VGNI de rats IM a été évaluée. Cette partie de l'étude a pour but de déterminer si le traitement avec de l'AMD3100 a un effet sur la production de la chimiokine ou sur son récepteur. En effet, si l'AMD3100 a un effet sur l'expression basale du SDF-1 α ou du CXCR4 chez les animaux témoins, cela peut influencer la réponse subséquente après un IM. Cette étude a déjà montré que l'expression de l'ARNm du SDF-1 α diminuait significativement dans le VGNI de rat, une semaine après un IM. Cette diminution n'est pas associée avec une réduction de l'expression de l'ARNm du récepteur CXCR4 (FIG. 3A). Dans cette même figure, il est possible de voir une diminution de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α chez les animaux témoins ayant reçus le traitement avec de l'AMD3100 (versus animaux témoins et région infarctée des animaux IM non traités), qui n'est toujours pas associée à une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur CXCR4. Ainsi, l'effet bénéfique de l'AMD3100 observé chez les animaux IM peut être associé à une diminution de l'expression du SDF-1 α à la suite de l'administration de l'AMD3100.

La diminution de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α dans le VGNI une semaine après un IM comparativement aux VG des animaux témoins suggère que l'expression de l'ARNm du SDF-1 α pourrait être directement influencée par l'hypertrophie myocytaire, tel qu'il a été énoncé dans la section 5.1. Il est important de noter que dans les cardiomyocytes néonataux

hypertrophiés, tout comme dans les VGNI, il y a augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ANP et du BNP et une diminution de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α (FIG. 4C). Il semble donc que l'hypertrophie est associée à la diminution de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α dans les VGNI. En effet, les cardiomyocytes sont identifiés comme une source du SDF-1 α (Pillarsetti et Gupta, 2001; Segret et al, 2006; Yu et al, 2006). Ceci suggère que l'hypertrophie myocytaire observée dans le VGNI peut occasionner une diminution de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α . De plus, il est possible de spéculer sur le fait que la diminution partielle de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α dans le VGNI soit un mécanisme de rétroaction négatif qui limite la réponse hypertrophique et l'effet inotropique négatif sur les cardiomyocytes.

Dans le VGNI de rats traités avec de l'AMD3100, il n'y a pas de diminution significative de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α comparativement aux animaux non traités une semaine après l'IM (FIG. 3A). Ceci peut certainement s'expliquer par le fait que l'hypertrophie des cardiomyocytes entraîne une réduction à un niveau minimum de l'ARNm du SDF-1 α , ce qui empêche une diminution additionnelle à la suite du traitement avec de l'AMD3100.

En résumé, l'AMD3100 entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm de l'ANP. Ceci peut s'expliquer soit par son effet de réduction de la taille de la cicatrice cardiaque ou encore par un effet direct du SDF-1 α sur le remodelage du VGNI. Par contre, le traitement avec de l'AMD3100 n'a aucun effet sur la fibrose du VGNI. De plus, l'AMD3100 provoque la diminution de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α dans le VG de rats témoins et cette diminution est conservée dans le VGNI de rats une semaine après l'IM traités ou non traités. Cette dernière section vient répondre au second objectif de cette étude soit de comprendre l'effet biologique du SDF-1 α directement sur les cellules cardiaques en provenance de rats néonataux. En effet, il est clair

que la stimulation avec le SDF-1 α des cellules cardiaques néonatales ne provoque pas une augmentation de la synthèse protéique, contrairement à la même stimulation sur des cardiomyocytes néonataux hypertrophiés. Cette réponse des cellules hypertrophiées n'est pas due à une relocalisation des récepteurs CXCR4 à la membrane et ne semble pas dépendre d'une régulation à la hausse de l'ARNm du récepteur. Aussi, cette stimulation peut être complètement inhibée par l'ajout de l'AMD3100. Il est important d'ajouter que l'hypertrophie induite par un prétraitement à la NA provoque, tout comme dans le VGNI, une diminution importante de l'expression de l'ARNm du SDF-1 α . Ce qui est en accord avec les résultats obtenus tout au long de cette étude.

Conclusion et perspectives futures

Le SDF-1 α est une chimiokine d'une importance capitale dans plusieurs fonctions de l'organisme telles que le développement, la régulation des maladies inflammatoires, l'angiogenèse ainsi que la migration de cellules souches en provenance de la moelle osseuse. Il est connu que le SDF-1 α a des rôles pouvant avoir un effet positif sur le remodelage ventriculaire après un IM, comme le recrutement de cellules souches de la moelle osseuse, son action antiapoptotique et son action angiogénique. Par contre, cette chimiokine peut aussi jouer un rôle négatif sur le remodelage ventriculaire aigu par son action d'inotrope négatif et par son effet chimiotaxique sur les neutrophiles. Le but principal de cette étude était de déterminer le rôle biologique prédominant du SDF-1 α dans la phase aiguë du remodelage ventriculaire chez les rats et les souris une semaine après un IM. Cette étude démontre que le SDF-1 α est sécrété par les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux cicatriciels une semaine après un IM. Ce profil d'expression suggère un gradient de la chimiokine SDF-1 α vers la cicatrice favorisant la migration des cellules souches de la moelle osseuse ainsi que des cellules inflammatoires vers cette région. Le blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4 par de l'AMD3100 entraîne une diminution de la taille de la cicatrice et une amélioration de la fonction ventriculaire chez le rat et la souris. De plus, le traitement avec de l'AMD3100 diminue significativement la taille de la cicatrice chez le rat ainsi que chez la souris. Les effets bénéfiques de l'AMD3100 sont en partie provoqués par la réduction de l'infiltration de la cicatrice par les cellules inflammatoires.

Afin d'expliquer la diminution de l'ARNm de l'ANP dans les VGNI, des études sur des cellules cardiaques en provenance de rats néonataux ont été effectuées. Il apparaît que la diminution de l'expression du SDF-1 α dans le VGNI est due à l'hypertrophie des cardiomyocytes de cette région, puisque lorsque hypertrophiés, l'expression du SDF-1 α diminue dans les cardiomyocytes néonataux. Quant à la diminution de l'expression de l'ARNm de l'ANP, elle semble être causée par un effet direct du SDF-1 α . En effet, à la

suite du traitement avec de l'AMD3100, la synthèse protéique des cardiomyocytes néonataux hypertrophiés est grandement diminuée, ce qui peut en partie expliquer la réduction de l'expression de l'ARNm de l'ANP dans le VGNI.

Mis ensemble, les résultats de cette étude suggèrent que le SDF-1 α , est l'une des chimiokines produites très tôt après un IM. Le SDF-1 α semble important dans le recrutement de plusieurs types cellulaires au myocarde endommagé. Cependant, son rôle principal semble être le maintien des cellules souches ainsi que certaines cellules inflammatoires dans la moelle osseuse. L'administration du SDF-1 α pendant la phase aiguë du remodelage peut donc avoir des effets délétères sur ce dernier malgré le recrutement potentiel de cellules souches de la moelle osseuse. Ainsi, le blocage de l'axe SDF-1 α /CXCR4 par de l'AMD3100 provoque des effets bénéfiques après un IM, tel que la diminution de la taille de la cicatrice cardiaque dans la phase aiguë du remodelage. En conclusion, cette étude suggère que le SDF-1 α affecte négativement la phase aiguë du remodelage ventriculaire.

Les résultats obtenus au cours de cette étude soulignent l'importance de reconfirmer par des approches plus précises certaines données obtenues. D'abord, des souris transgéniques (*knock out* pour le CXCR4 ou le SDF-1 α ou encore surexprimant le CXCR4 ou le SDF-1 α) pourraient mieux répondre aux questions posées dans cette étude. De plus, il serait intéressant de voir si l'AMD3100 bloque le recrutement à la cicatrice cardiaque de cellules souches de moelle osseuse injectées. Si la réponse à cette question est négative, cela suggère fortement qu'il existe d'autres chimiokines plus importantes que le SDF-1 α pour faciliter le recrutement des cellules souches de la moelle osseuse à la cicatrice. Dans le même ordre d'idée, le laboratoire du *Dr Calderone* possède des résultats préliminaires concernant la présence d'une autre chimiokine, 6-CKine, dans le cœur ischémié. Il serait intéressant de déterminer le rôle de cette chimiokine dans le remodelage

cardiaque et le recrutement des cellules souches de moelle osseuse à la cicatrice.

Références

Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004 Nov 23; 110(21): 3300-3305.

Aceves JL, Archundia A, Diaz G, Paez A, MAsso F, Alvarado M, Lopez M, Aceves R, Ixcamparij C, Puente A, Vilchis R, Montano LF. Stem cell perspectives in myocardial infarctions. *Rev Invest Clin*. 2005 Mar; 57(2): 156-162.

Ahlers BA, Song J, Wang J, Zhang XQ, Carl LL, Tadros GM, Rothblum LI, Cheung JY. Effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol*. 2005 Jun; 98(6):2169-76.

Aiuti A, Webb IJ, Springer T. The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34+ Progenitors to Peripheral Blood. *J Exp Med*. 1997; 185(1): 111-120.

Akimoto M, Hashimoto H, Maeda A, Shigemoto M, Yamashita K. Roles of angiogenic factors and endothelin-1 in gastric ulcer healing. *Clin Sci*. 2002; **103**(48): 450S-454S.

Alvarez-Buylla A, Lois C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*. 1995 May; **13**(3): 263-272.

Amara A, Le Gall S, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, Baggiolini M, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. HIV Coreceptor Downregulation as Antiviral Principle: SDF-1a-dependent Internalization of the Chemokine Receptor CXCR4 Contributes to Inhibition of HIV Replication. *J Exp Med*. 1997; **186**(1): 139-146.

Andreka P, Tran T, Webster KA, Bishopric NH. Nitric oxide and promotion of cardiac myocytes apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2004 Aug; **263**(1-3): 35-53.

Anversa P, Kajstura J. Myocyte Cell Death in the Diseased Heart. *Circ Res*. 1998; **82**: 1231-1233.

Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*. 1998; **83**: 1-14.

Anversa P, Leri A, Beltrami CA, Guerra S, Kajstura J. Myocyte death and growth in the failing heart. *Lab Invest*. 1998; **78**: 767-786.

Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature*. 2002 Janv; **415**: 240-243.

Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-Term Hematopoietic Stem Cells Require Stromal Cell-Derived Factor-1 for Colonizing Bone Marrow during Ontogeny. *Immunity*. 2003; **19**: 257-267.

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, Dicorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal cell-derived factor-1 on stem cell homing and tissue regeneration in ischemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003; **362**:697-703.

Augustin H. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; **247**: 38-45.

Awazu M, Imada T, Kon V, Inagami T, Ichikawa I. Role of endogenous atrial natriuretic peptide in congestive heart failure. *Am J Physiol*. 1989 Sep; **257**(3 Pt 2): R641-646.

Ball SG. The sympathetic nervous system and converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989; **13**(suppl 3): S17-S21.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; **428**(6983):668-673.

Balsam LB et Robbins RC. Haematopoietic stem cells and repair of the ischemic heart. *Clin Sci*. 2005; **109**:483-492.

Barile L, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Jul-Aug; **50**(1):31-48.

Barrett S, Honbo N, Karlier JS. Alpha 1-adrenoceptor-mediated inhibition of cellular cAMP accumulation in neonatal rat ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1993 Apr; **347**(4): 384-393.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep 19; **114**(6):763-76.

Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Prolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jun; **290**(6): H2196-H2203.

Biologie cellulaire 1; Les junctions intercellulaires. Adresse URL : www.bio.espci.fr/scolarite/c_BIO/cell/cell7.htm.

Blanco J, Barretina J, Henson G, Bridger G, De Clercq E, Clotet B, Este JA. The CXCR4 antagonist AMD3100 efficiently inhibits cell-surface-expressed human immunodeficiency virus type 1 envelope-induced apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan; **44**(1): 51-56.

Blaufarb IS, Sonnenblick EH. The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling. *Am J Cardiol*. 1996 May; **77**(13): 8C-16C.

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A Highly Efficacious Lymphocyte Chemoattractant Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996; **184**: 1101-1109.

Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1995 Oct; **30**(4): 537-543.

Booz GW, Baker KM. The role of the renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiac remodeling. *Blood Press Suppl*. 1996; **2**: 10-18.

Braun M, Wunderlin M, Spieth K, Knochel W, Gierschik P, Moepps B. *Xenopus laevis* Stromal cell-derived factor 1: conservation of structure and function during vertebrate development. *J Immunol*. 2002 Mar 1; **168**(5): 2340-2347.

Broxmeyer HE, Orshell CM, Clappy DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srour EF. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med*. 2005 Apr; **201**(8): 1307-1318.

Burroughs L, Mielcarek M, Little MT, Bridger G, Macfarland R, Fricker S, Labrecque J, Sandmaier BM, Storb R. Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. *Blood*. 2005 Dec; **106**(12): 4002-4008.

Buxton IL, Brunton LL. Action of the cardiac alpha 1-adrenergic receptor. Activation of cyclic AMP degradation. *J Biol Chem*. 1985 Jun; **260**(11): 6733-6737.

Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophy are associated with distinct molecular phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*. 1995; **92**: 2385-2390.

Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15; **101**(4):812-8.

Calderone A, Abdelaziz N, Colombo F, Schreiber KL, Rindt H. A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocyte hypertrophy and gene expression. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Jun; **32**(6): 1127-1140.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature*. 2004; **10**(8): 858-864.

Ceradini DJ, Gurtner GD. Homing to Hypoxia: HIF-1 as a Mediator of Progenitor Cell Recruitment to Injured Tissue. *TMC*. 2005; **15**(2): 57-63.

Chen Qm, Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2002; **2**(1): 43-57.

Chun YS, Htun JY, Kwak YG, Kim IS, Kim DH, Choi E, Kim MS, Park JW. Hypoxic activation of the atrial natriuretic peptide gene promoter through direct and indirect actions of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem J*. 2003; **370**: 149-157.

Claps CM, Corcoran KE, Cho KJ, Rameshwar P. Stromal derived growth factor-1 alpha as a beacon for stem cell homing in development and injury. *Curr Neurovasc Res*. 2005 Oct; **2**(4): 319-329.

Corasaniti MT, Piccirilli S, Paoletti A, Nistico R, Stringaro A, Malorni W, Finazzi-Agro A, Bagetta G. Evidence that the HIV-1 coat protein gp120 causes neuronal apoptosis in the neocortex of rat via a mechanism involving CXCR4 chemokine receptor. *Neurosci Lett*. 2001; **312**: 67-70.

Creutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts : Cardiac Extracellular Matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2002; **8**(6 suppl): S344-S348.

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Seisdedos FA, Virelizer JL, Baggiolini M, Sykes BD, Lewis IC. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo J*. 1997 Dec 1; **16**(23): 6996-7007.

Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*. 1996; **86**: 907-916.

Curnock AP, Ward SG. Development and characterization of tetracycline-regulated phosphoinositide 3-kinase mutants: assessing the role of multiple phosphoinositide 3 kinases in chemokine signaling. *J Immunol Meth.* 2003; **273**: 29-41.

Dai W, Field LJ, Rubart M, Reuter, S, Hale SL, Zweigerdt R, Grainchen RE, Kay GL, Jyrala AJ, Colman A, Davidson BP, Pera M, Kloner RA. Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; **43**: 504-516.

Dealwis C, Fernandez EJ, Thompson DA, Simon RJ, Siani MA, Lolis E. Crystal structure of chemically synthesized (N33A) stromal cell-derived factor 1 α , a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9; **95**(12): 6941-6946.

De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Baba M, Schols D, Nakashima H, Balzarini J, Debyser Z, Murrer BA, Schwartz D, Thornton D, Bridger G, Fricker S, Henson G, Abrams M, Picker D. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. *Proc Nat Acad Sci.* 1992; **89**: 5286-5290.

De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Balzarini J, Witvrouw M, De Vreese K, Debyser Z, Rosenwirth P, Datema PR et al. Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; **38**: 668-674.

De Clercq E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem.* 2005 Sep; **5**(9): 805-824.

De Gasparo M, Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev.* 2002 Oct; **7**(4) : 347-358.

De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, Bridger G, Biliau A, Schols D, Matthys P. Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005 Aug; **7**(6): 1208-1220.

Delcayre C, Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Dec; **34**(12): 1577-1584.

Dendorfer A, Dominiak P, Schunkert H. ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol.* 2005; (170):407-42.

De Vreese K, Reymen D, Griffin P, Steinkasserer A, Werner G, Bridger GJ, Esté J, James W, Henson G, Desmyter J et al. The bicyclams, a new class of potent human immunodeficiency virus inhibitors, Block viral entry after binding. *Antivir Res.* 1996; **29**: 209-219.

De Vreese K, Kofler-Mongold V, Leutger C, Weber V, Vermeire K, Schacht S, Anné J, De Clercq E, Datema R, Werner G. The Molecular Target of Bicyclams, Potent Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Replication. *J Virol.* 1996; **70**(2): 689-696.

Dexler H, Hanze J, Finckh MD, Lu W, Just H, Lang RE. Atrial natriuretic peptide in a rat model of cardiac failure. *Circulation.* 1989; **79**:620-633.

Dostal DE, Booz GW, Baker KM. Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. *Mol Cell Biochem.* 1996 Apr; **157**(1-2): 15-21.

Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, Trudeau LE, Villeneuve L, Calderone A. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J Cell Physiol.* 2005 Jul; **204**(1):51-62.

Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passequé E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell.* 2008 Mar; **13**(3):206-220.

Dutt P, Wang JF, Gropman JE. Stromal Cell-Derived Factor-1 α and Stem Cell Factor/kit Ligand Share Signaling Pathways in Hemopoietic Progenitors : A Potential Mechanism for Cooperative Induction of Chemotaxis. *J Immunol.* 1998; **161**: 3652-3658.

Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol.* 1992; **87**(suppl 2): 183-89.

El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A. Resident nestin⁺ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium. *Hypertension.* 2005 Nov; **46**(5):1219-1225.

El-Helou V, Bel-Hadj S, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Calderone A. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis was attenuated in hypertrophied neonatal rat ventricular myocytes. *Nitric Oxide.* 2006 Jun; **14**(4):316-326.

Fazel S, Tang GH, Angoulvant D, Cimini M, Weisel RD, Li RK, Yau TM. Current status of cellular therapy for ischemic heart disease. *Ann Thorac Surg.* 2005 Jun; **79**(6): S2238-S2247.

Feurstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signalling pathways. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb; **45**(3): 560-569.

Fisher SA, Langille BL, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ. Res.* 2000; **87**: 856-864.

Fishma WH, Anversa P. Stem Cell Therapy for Myocardial Regeneration : The Future is Now. *Heart Dis.* 2002 Jul-Aug; **4**(4):205.

Flomenberg N, DiPersio J, Calandra G. Role of CXCR4 receptor blockade using AMD3100 for mobilization of autologous hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol.* 2005; **114**(4): 198-205.

Fondation des maladies du Coeur, à la conquête de solutions, 2007. Adresse URL : <http://www.fmcoeur.qc.ca/>.

Fraidenraich D, Stillwell E, Romero E, Wilkes D, Manova K, Basson CT, Benezra R. Rescue of Cardiac Defects in Id Knockout Embryos by Injection of Embryonic Stem Cells. *Science.* 2004 Oct; **306**:247-252.

Frank KF, Bölck B, Brixius K, Kranias EG, Schwinger RH. Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 2002; **97** Suppl 1:172-178.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002 Jan; **53**(1): 31-47.

Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the Heart. A New Therapeutic Target? *Circulation.* 2004; **109**:1580-1589.

Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006 May; **27**(9): 1114-1122.

Fruehauf S, Seeger T. New strategies for mobilization of hematopoietic stem cells. *Future Oncol.* 2005 Jun; **1**(3): 375-383.

Fruehauf S, Seeger T, Toplay J. Innovative strategies for PBPC mobilization. *Cytotherapy.* 2005; **7**(5): 438-446.

Gaertner R, Logeart D, Michel JB, Mercadier JJ. Remodelage précoce du ventricule gauche après un accident coronarien aigu. *Med.Sc.* 2004 ; **20**: 643-650.

Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE. The α -chemokine, Stromal Cell-derived Factor-1 α , Binds to the Transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 Receptor and Activates Multiple Signal Transduction Pathways. *J Biol Chem.* 1998; **273**(36): 23169-23175.

Gerdes AM, Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995 Mar; **27**(3): 849-856.

Gibejovà A. Chemokines Receptors. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 2000 July; **143**: 9-18.

Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, Gick G, El-Sherif N. Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Mar; **30**(3): 627-637.

Goldstein S, Sabbah H. Ventricular remodeling and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; **24** Suppl 3: S27-S31.

Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; **6**(2): 109-118.

Guleng B, Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Tanaka Y, Washida M, Morikane K, Fukushima Y, Yamori T, Tsuruo T, Kawabe T, Miyagishi M, Taira K, Sata M, Omata M. Blockade of the Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4 Axis Attenuates In Vivo Tumor Growth by Inhibiting Angiogenesis in a Vascular Endothelial Growth Factor-Independent Manner. *Cancer Res.* 2005 July; **65**(13): 5864-5871.

Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine Receptors in Human Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 1998; **273**(7): 4282-4287.

Guyton AC et Hall JE. *Textbook of medical physiology*, 10^{ème} édition, International edition, 2000. pp 1-1064.

Hamada T, Möhle R, Hesselgesser J, Hoxie J, Nachman RL, Moore MAS. Transendothelial Migration of Megakaryocytes in Response to Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF 1) Enhances Platelet Formation. *J Exp Med.* 1998; **188**(3): 539-548.

Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper S, Horuk R, Ali H, Snyderman R. Regulation of Human Chemokine Receptors CXCR4. *J Biol Chem*. 1997 Nov; **272**(45): 28726-28731.

Hatse S, Princen K, Bridger G, Dr Clercq E, Schols D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Letters*. 2002 July; **527**: 255-262.

Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998; **82**: 1111-1129.

Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, Bridger G, Henson GW. Pharmacokinetics and safety of AMD3100, a novel antagonist of the CXCR4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2000 Jun; **44**(6): 1667-1673.

Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, Jackson JB, Coombs RW, Glesby MJ, Flexner CW, Bridger GJ, Badel K, MacFarland RT, Henson GW, Calandra G; AMD3100 HIV Study Group. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004 Oct; **37**(2): 1253-1262.

Herbein G, Mahlke U, Batliwalla F, Gergersen P, Pappas T, Butler J, O'Brien WA, Verdin E. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophage through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature*. 1998; **395**: 189-194.

Hesselgesser J, Halks-Miller M, DeVecchio V, Peiper S, Hoxie J, Kolson D, Taub D, Horuk R. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4; Functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol*. 1997; **7**: 112-121.

Hesselgesser J, Liang M, Hoxie J, Greenberg M, Brass LF, Orsini MJ, Taub D, Horuk R. Identification and Characterization of the CXCR4 Chemokine Receptor in Human T Cell Lines: Ligand Binding, Biological Activity, and HIV-1 Infectivity. *J Immunol*. 1998; **160**: 877-883.

Hoffmeyer MR, Scalia R, Ross CR, Jones SP, Lefer DJ. PR-39, a potent neutrophil inhibitor, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol*. 2000; **279**: H2824-H2428.

Horuk R, Peiper SC. Chemokines: Molecular double agents. *Curr Biol*. 1996; **6**(12): 1581-1582.

Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol*. 2002 Jul; **197**(4): 468-478.

Hu X, Dai S, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Mu J, Guo Y, Bolli R, Rokosh G. Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation*. 2007; **116**(6): 654-63.

Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocytes function. *Ann Hematol*. 2002; **81**(Suppl 2): S2-S5.

Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge ASB, Zawadzka A, Wetzel K, Sawyer DB, Colucci WS, Apstein CS, Liao R. Cell Therapy Attenuates Deleterious Ventricular Remodeling and Improves Cardiac Performance After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2001; **103**: 1920-1927.

Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak MZ, Cabuhat ML. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34+ cells in response to chemokines. *Exp Hematol*. 2000; **28**: 1274-1285.

Jaquet K, Krause KT, Denschel J, Faessler P, Nauerz M, Geidel S, Boczor S, Lange C, Stute N, Zander A, Kuck KH. Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells Dev*. 2005 Jun; **14**(3): 299-309.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SSW. Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain. *Neurosci*. 2004; **355**: 236-240.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SSW. Interactions of Chemokine and Chemokine Receptors Mediate the Migration of Mesenchymal Stem Cells to the Impaired Site in the Brain After Hypoglossal Nerve Injury. *Stem Cells*. 2004; **22**: 415-427.

Jirmar R, Pelouch V. The role of the myocardial interstitium in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Cor Vasa*. 1993; **35**(5): 206-209.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix, when is enough enough ? *Circ*. 2003; **108**: 1395-1403.

Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IM. Expression of Gq alpha and PLC-B in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation*. 1998; **97**: 892-899.

Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *Histochem Cytochem*. 1995 Aug; **43**(8): 843-847.

Kajstura J, Leri A, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am*. 2004 Feb; **84**(1): 161-177.

Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest*. 2000; **80**:1127-1136.

Kanellakis P, Slater NJ, Du XJ, Bobik A, Curtis DJ. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2006 Apr; **70**(1): 117-125.

Kang PM, Izumo S. Apoptosis and Heart Failure A Critical Review of the Literature. *Circ Res*. 2000; **86**: 1107-1113.

Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997; **81**(2):187-195.

Kasama S, Furuya M, Toyama T, Ichikawa S, Kurabayashi M. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008 Jun; **29**(12): 1485-1494.

Kayali AG, Gunst KV, Campbell IL, Stotland A, Kritzik M, Liu G, Flodstrom-Tullberg M, Zhang YQ, Sarvnick N. The stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas. *J Cell Biol*. 2003; **163**(4): 859-869.

Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE, Salgia R. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 2002 Nov; **62**(21): 6304-6311.

Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokine: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol*. 1999; **65**: 6-15.

Kim HK, Kim JE, Chung J, Han KS, Cho HI. Surface expression of neutrophil CXCR4 is down-modulated by bacterial endotoxin. *Int J Hematol*. 2007 Jun; **85**(5):390-6.

Koch KC, Schaefer WM, Liehn EA, Rammos C, Mueller D, Schroeder J, Dimassi T, Stopinski T, Weber C. Effect of catheter-based transendocardial delivery of stromal cell-derived factor 1 alpha on left ventricular function and perfusion in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jan; **101**(1): 69-77.

Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**:736-746.

Kohl P, Camelliti P, Burton FL, Smith GL. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol.* 2005 Oct; **38**(4 Suppl): 45-50.

Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nalger A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003; **112**: 160-169.

Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Japanese Circulation Journal.* 2001 May; **65**(5): 353-358.

Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000 Sep; **6**(9): 3530-3535.

Kucia M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, Ratajczak J, Rezzoug F, Iltstad ST, Bolli R, Ratajczak MZ. Cells Expressing Early Cardiac Markers Reside in the Bone Marrow and Are Mobilized Into the Peripheral Blood After Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2004; **95**: 1191-1199.

Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation.* 2002 Jul 2; **106**(1):130-135.

Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami Y, Ikeda Y. Endothelial Differentiation Potential of Human Monocyte-derived Multipotential Cells. *Stem Cells.* 2006 Dec; **24**(12): 2733-2743.

Laflamme MA and Murry CE. Regenerating the heart. *Nature Biotech.* 2005; **23**: 845-856.

Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 2005 Sep; **106**(6): 1901-1910.

Lapidot T, Kollet O. The essential role of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m^{null} mice. *Leukemia.* 2002; **16**: 1999-2003.

Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002; **30**: 973-981.

Larochelle A, Krouse A, Metzger M, Orlic D, Donahue RE, Fricker S, Bridger G, Dunbar CE, Hematti P. AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in non-human primates. *Blood*. 2006 May; **9**(107): 3772-3778.

Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34+ cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*. 2002; **99**: 1117-1129.

Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*. 2003 Apr 15; **42**(2): 139-148.

Le cerveau à tous. Adresse URL : www.lecerveau.mcgill.ca/.

Lee CH, Liu QH, Tomkowicz B, Yi Y, Freedman BD, Collman RG. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signalling pathways. *J Leuko Biol*. 2003 Nov; **74**: 676-682.

Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med*. 2004; **5**(2): 82-98.

Lee MS, Makkar RR. Stem-cell Transplantation in Myocardial Infarction: A Status Report. *Ann Intern Med*. 2004; **140**:729-737.

Lee RT, Bloch KD, Pfeffer JM. Atrial natriuretic factor gene expression in ventricles of rats with spontaneous biventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 1998; **81**(2):431-434.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol. Rev*. 2005; **85**: 1373-1416.

Liehn EA, Merx MW, Postea O, Becher S, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, Kelm M, Zerneck A, Weber C. Ccr1 deficiency reduces inflammatory remodelling and preserves left ventricular function after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2008 Mar-Apr; **12**(2):496-506.

Lijnen PJ, Petrov VV. Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003 Sep; **25**(7): 541-564.

Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003 Oct 15; **102**(8):2728-2730.

Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, Dehner C, Badel K, Calandra G, Christensen J, Wood B, Price TH, Dale DC. Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion*. 2005 Mar; **45**(3): 295-300.

Loetscher P, Gong JH, Dewald B, Baggiolini M, Clark-Lewis I. N-terminal Peptides of Stromal Cell-derived Factor-1 with CXC Chemokine Receptor 4 Agonist and Antagonist Activities. *J Biol Chem*. 1998 Aug; **273**(35): 22279-22283.

Lucchesi BR. Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. *Arzneimittelforschung*. 1994 Mar; **44**(3A): 420-32.

Ma J, Ge J, Zhang S, Shen J, Chen L, Wang K, Zou Y. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2005; **100**: 217-233.

MacLellan WR et Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol*. 2000; **62**: 289-319.

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Kowalska MA, Vilaire G, Pan ZK, Honczarenko M, Marquez LA, Poncz M, Ratajczak MZ. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood*. 2000 Dec; **96**(13): 4142-4151.

Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cell biology – a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol*. 2005. **52**(2): 353-358.

Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *American J of Pathol*. 1995; **148**(1): 3-15.

Martin C, Bridger GJ, Rankin SM. Structural analogues of AMD3100 mobilise haematopoietic progenitor cells from bone marrow in vivo according to their ability to inhibit CXCL12 binding to CXCR4 in vitro. *Br J Haematol*. 2006 Aug; **134**(3):326-329.

Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J*. 2008 Jun 3. Epub ahead of print.

Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, De Clercq E, Billiau A, Schols D. AMD3100, a Potent and Specific Antagonist of the Stromal Cell-Derived Factor-1 Chemokine Receptor CXCR4, Inhibits Autoimmune Joint Inflammation in IFN-g Receptor-Deficient Mice. *J. Immunol*. 2001 Oct **167**(8): 4686-4692.

McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol*. 1999 Sep 15; **213**(2):442-456.

Medecinenet. 2004. Adresse URL : www.medecinenet.com.

Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JCJ, Cain BS, Shames BD, Meng X, Harken AH. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a p38 mitogen activated protein kinase-dependant mechanism. *Surgery*. 1998; **124**: 291-296.

Menasché P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Jul-Aug; **50**(1): 7-17.

Mercier I, Pham-Dang M, Clément R, Gosselin H, Colombo F, Rouleau JL, Calderone A. Elevated mean arterial pressure in ovariectomized rat was normalized by ET(A) receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2002 Jul; **136**(5): 685-692.

Microbiology and Immunology on-line. University of South Carolina, School of Medicine. Virology, chapter nine, antiviral chemotherapy. 2006. Adresse URL: www.med.sc.edu:85/lecture/chemo.htm.

Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT et Mikawa T. Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 467-471.

Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, Vannier JP, Soria J, Vasse M, Soria C. SDF-1 Activity on Microvascular Endothelial Cells: Consequences on Angiogenesis in in Vitro and in Vivo Models. *Throm Res*. 2000; **99**: 587-594.

Misao Y, Takemura G, Arai M, Ohno T, Onogi H, Takahashi T, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Importance of recruitment of bone marrow-derived CXCR4(+) cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF. *Cardiovasc Res*. 2006 Aug; **71**(3): 455-465.

Mitu M, Mitu F. Heart failure due to ischemia--the adaptive mechanisms. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 1999 Jan-Jun; **103**(1-2):16-23.

Möhle R, Bautz F, Rafii S, Moore MAS, Brugger W, Kanz L. The Chemokine Receptor CXCR-4 Is Expressed on CD34+ Hematopoietic Progenitor and Leukemic Cells and Mediates Transendothelial Migration Induced by Stromal Cell-derived Factor-1. *Blood*. 1998; **91**(12): 4523-4530.

Mokry J, Nemecek S. Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol*. 1998; **44**(5): 155-161.

Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolar Z, English D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev*. 2004 Dec; **13**(6): 658-664.

Molkentin JD, Lu JR, Antos, CL, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998; **93**:215-228.

Mouquet F, Pfister O, Jain M, Oikonomopoulos A, Ngoy S, Summer R, Fine A, Liao R. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res*. 2005 Nov; **97**(11): 1090-1092.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar; **410**(6824): 50-56.

Muller P, Beltrami AP, Cesselli D, Pfeiffer P, Kazakov A, Bohm M. Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; **39**: 377-387.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004 Apr; **428**(6983):664-668.

Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri Annarosa. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest.* 2003; **111**: 1457-1459.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996 Aug; **382**(6592): 635-638.

Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar; **91**(6): 2305-2309.

Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocytes hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation.* 1998; **98**:794-799.

Narine K, De Wever O, Van Valckenborgh D, Francois K, Bracke M, DeSmet S, Mareel M, Van Nooten G. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Eng.* 2006 Oct; **12**(10): 2707-16.

New England Journal of Medicine. Originellement publié en janvier 1999. Adresse URL : www.medscape.com/viewarticle/502691_print.

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 Apr; **138**(8):1485-94.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ. Res.* 2004; **94**: 1543-1553.

Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 2007 May; **21**(7):1345-1357.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE. Bone marrow-derived haematopoietic cell generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 2004; **10**:494-501.

Olivares EL, Ribeiro VP, Werneck de Castro JP, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, Mill JG, Dohmann HF, Dos Dantos RR, De Carvalho AC, Masuda MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug; **287**(2): H464-H470.

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 Apr; **410**(6829): 701-705.

Orlic D. BM stem cells and cardiac repair: where do we stand in 2004? *Cytotherapy*. 2005; **7**(1): 3-15.

Paul S. Ventricular remodeling. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2003 Dec; **15**(4): 407-411.

Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol*. 2008 Jul; **15**(4):285-92.

Perin EC, Silva GV. Stem cell therapy for cardiac diseases. *Curr Opin Hematol*. 2004 Nov; **11**(6):399-403.

Petrov VV, van Pelt JF, Vermeesch JR, Van Duppen VJ, Vekemans K, Fagard RH, Lijnen PJ. TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages. *Exp Cell Res*. 2008 Apr 15; **314**(7): 1480-94.

Piano MR, Carrigan TM. Cellular cardiomyoplasty: a new therapeutic approach for regenerating the myocardium. *J Cardiovasc Nurs*. 2003 Nov; **18**(5): 374-381.

Pillarsetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)₁: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*. 2001 Oct; **25**(5): 293-300.

Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2005 Jun 10; **280**(23): 22473-22481.

Poelmann RE et Gittenberger-de Groot AC. Apoptosis as an instrument in cardiovascular development. *Birth Defects Res*. 2005; **75**: 305-313.

Popik W, Hesselgesser JE, Pitha PM. Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to CD4 and CXCR4 Receptors Differentially Regulates Expression of Inflammatory Genes and Activates the MEK/ERK Signaling Pathway. *J Virol*. 1998 Aug; **72**(8): 6406-6413.

Poulsen SH. Clinical aspects of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography following acute myocardial infarction. *Dan Med Bull*. 2001 Nov; **48**(4): 199-210.

Pyo RT, Sui J, Dhume A, Palomeque J, Blaxall BC, Diaz G, Tunstead J, Logothetis DE, Hajjar RJ, Schecter AD. CXCR4 modulates contractility in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Nov; **41**(5): 834-844.

Qi M, Shannon TR, Euler DE, Bers DM, Samarel AM. Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol*. 1997 May; **272**(5 Pt 2):H2416-H2424.

Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO, Carpentier A. Cellular therapy reverse myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 May; **121**(5): 871-878.

Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*. 2004 Jan; **18**(1): 29-40.

Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003 Sep; **2**(3): 242-256.

Rij RPV, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 1998; **12**: F85-F90.

Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehle R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J, Fleischmann BK. Cellular Cardiomyoplasty Improves Survival After Myocardial Injury. *Circulation*. 2002; **105**: 2435-2441.

Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Nov; **100**(23): 13513-13518.

Ruwhof C, Van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*. 2000 Jul; **47**(1): 23-37.

Saito N, Chihara J. Chemokines (RANTES, eotaxin, etc). *Nippon Rinsho*. 2001 Oct; **59**(10) : 1900-1905.

Sanchez X, Cousins-Hodges B, Aguilar T, Gosselink P, Lu, Z, Navarro J. Activation of HIV-1 Coreceptor (CXCR4) Mediates Myelosuppression. *J Biol Chem*. 1997; **272**(44): 27529-27531.

Saxena PR. Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992; **19**(suppl 6): S80-S88.

Schipke JD, Korbmacher B, Dorszewski A, Selcan G, Sunderdiek U, Arnold G. Haemodynamic and energetic properties of stunned myocardium in rabbit hearts. *Heart*. 1996 Jan; **75**(1): 55-61.

Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1a in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2003; **108**: 2491-2497.

Schols D, Stuyf S, Damme JV, Esté JA, Henson G, De Clercq E. Inhibition of T-tropic HIV Strain by Selective Antagonization of the Chemokine Receptor CXCR4. *J Exp Med*. 1997 Oct; **186**(8): 1383-1388.

Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, Probst-Kepper M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodien J, Buer J, Lauber J. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer*. 2002 Apr; **86**(8): 1250-1256.

Schwarz ER, Patterson M, Kloner RA. Cardiomyocyte transplantation—a cell replacement for repair of myocardial infarction? *Z Kardiol*. 1998 Jan; **87**(1): 1-7.

Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, Sabri A, Samuel JL. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation*. 1997 Nov; **96**(9 suppl): 188-193.

Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2002 Oct; **62**(20): 5930-5938.

Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008 Feb; **451**(7181):937-942.

Segret A, Rucker-Martin C, Pavoine C, Flavigny J, Deroubaix E, Chatel MA, Lombet A, Renaud JF. Structural localization and expression of CXCL12 and CXCR4 in rat heart and isolated cardiac myocytes. *J Histochem Cytochem.* 2007 Feb; **55**(2): 141-150.

Sehgal A, Keener C, Boynton AL, Warrick J, Murphy GP. CXCR4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol.* 1998; **69**: 99-104.

Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 May; **259**(1): 8-14.

Sergejeva S, Malmhall C, Lotvall J, Pullerits T. Increased number of CD34+ cells in nasal mucosa of allergic rhinitis patients: inhibition by a local corticosteroid. *Clin Exp Allergy.* 2005 Jan; **35**(1): 34-38.

Serini G, Gabbiani G. Minireview: Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Exp Cell Res.* 1999; **250**: 273-283.

Shao H, Tan Y, Eton D, Yang Z, Uberti MG, Li S, Schulick A, Yu H. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels. *Stem Cells.* 2008 May; **26**(5):1376-84.

Shepherd RM, Capoccia BJ, Devine SM, Dipersio J, Trinkaus KM, Ingram D, Link DC. Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD3100. *Blood.* 2006 Dec 1; **108**(12):3662-3667.

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinihara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF 1) gene. *Genomics.* 1995; **28**: 495-500.

Signoret N, Rosenkilde MM, Klasse PJ, Schwartz TW, Malim MH, Hoxie JA, Marsh M. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Science.* 1998; **111**: 2819-2830.

Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest.* 1983 Aug; **72**(2): 732-738.

Simpson P. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res.* 1985 Jun; **56**(6): 884-894.

Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE, Kamp TJ. Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Jan; **40**(1): 195-200.

Smart N et Riley PR. The Stem Cell Movement. *Circ. Res.* 2008 Jun; **102**:1155-1168.

Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, Goumans MJ, Doevendans PA. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan; **9**(1): 25-36.

Statistique Canada, 2006. Adresse URL: <http://www.statcan.ca/menu-fr.htm>.

Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Dec; **16**(6): 593-609.

Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 1998; **76**: 725-746.

Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* 2000 May; **46**(2): 250-256.

Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood.* 2004 Jul 15; **104**(2): 565-71.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiological Rev.* 1999 Jan; **79**(1): 215-262.

Système rénine-angiotensine-aldostérone. Adresse URL <http://fr.wikipédia.org>.

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 2002; **62**: 1832-1837.

Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther.* 2004 Oct; **104**(1): 1-16.

Tang YL. Cellular therapy with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure. *Methods Mol Med.* 2005; **112**: 193-204.

Tarzami ST, Miao W, Lopez L, Factor SM, Berman JW, Kitsis RN. Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection. *Circulation*. 2003;**108**:2387-2392.

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type 1 membrane proteins. *Science*. 1993 Jul; **261**(5121): 600-603.

Tavor S, Petit I, Porozov S, Aigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, Shemtov N, Deutsh V, Naparstek E, Nagler A, Lapidot T. CXCR4 Regulates Migration and Development of Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells in Transplanted NOD/SID Mice. *Cancer Res*. 2004 Apr; **64**: 2817-2824.

Thompson CA, Reddy VK, Srinivasan A, Houser S, Hayase M, Davila A, Pomerantsev E, Vacanti JP, Gold HK. Left ventricular functional recovery with percutaneous, transvascular direct myocardial delivery of bone marrow-derived cells. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Sep; **24**(9): 138501392.

TI TLY, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Bril A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 2001;**104**: 2588-2594.

Torella D, Ellison GM, Mendez-Ferrer S, Ibanez B, Nadal-Ginard B. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Mar; 3 Suppl 1: S8-S13.

Toth PT, Ren D, Miller RJ. Regulation of CXCR4 Receptor Dimerization by the Chemokine SDF-1a and the HIV Coat Protein gp120: A Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Study. *JPET*. 2004; **310**(1): 8-17.

Tran PB, Ren D, Veldhouse TJ, Miller RJ. Chemokine Receptors Are Expressed Widely by Embryonic and Adult Neural Progenitor Cells. *J Neurosci Res*. 2004; **76**: 20-34.

Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *PNAS*. 2003 Sep; **100**(18): 10440-10445.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res*. 2004; **95**: 343-353.

Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. 2004 Sep; **110**: 1209-1212.

Verson T. Les pathologies cardio-vasculaires. Adresse URL : <http://t.verson.free.fr>.

Voller H, Dietz R. Left ventricular remodeling: pathophysiological mechanisms and therapeutic recommendations. *Z Kardiol*. 1999 Dec; **88**(12): 982-990.

Wang JF, Liu ZY, Groopman JE. The α -Chemokine Receptor CXCR4 Is Expressed on the Megakaryocytic Lineage From Progenitor to Platelets and Modulates Migration and Adhesion. *Blood*. 1998; **92**(3): 756-764.

Wang X, Li C, Chen Y, Hao Y, Zhou W, Chen C, Yu Z. Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1 α activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun 27; **371**(2):283-8. Epub 2008 Apr 22.

Wang Y, Ahmad N, Wani MA, Ashraf M. Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; **37**:1041-1052.

Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocytes hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev*. 2002 Oct; **7**(4): 317-325.

Yamaguchi JI, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Isner JM, Asahara T. Stromal Cell-derived Factor 1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization. *Circulation*. 2003; **107**: 1322-1328.

Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodeling in mice. *Exp Physiol*. 2002 Sep; **87**(5): 547-55.

Yang J, Zhou W, Zheng W, Ma Y, Lin L, Tang T, Lui J, Yu J, Zhou X, Hu J. Effects of Myocardial Transplantation of Marrow Mesenchymal Stem Cells Transfected with Vascular Endothelial Growth Factor for the Improvement of Heart Function and Angiogenesis after Myocardial Infarction. *Cardiology*. 2006 May; **107**(1): 17-29.

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb; **45**(3): 630-641.

Yue P, Long CS, Austin R, Chang KC, Simpson PC, Massie BM. Post-infarction heart failure in the rat is associated with distinct alterations in cardiac myocyte molecular phenotype. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Aug; **30**(8): 1615-1630.

Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, Su FW, Wang J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene.* 2006 Jun; **374**: 174-179.

Zarain-Herzberg A. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 May; **84**(5):509-521.

Zeelenberg IS, Ruuls-Van SL, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 2003; **63**: 3833-3839.

Zhang M, Mal, N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari A, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J.* 2007 Oct; **21**: 1-11.

Zhang XQ, Tillotson DL, Moore RL, Zelis R, Cheung JY. Na⁺/Ca²⁺ exchange currents and SR Ca²⁺ contents in postinfarction myocytes. *Am J Physiol.* 1996 Dec; **271**(6 Pt 1):C1800-C1807.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines : A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity.* 2000; **12**: 121-127.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 1998 Jun 11; **393**(6685): 595-599.