

Université de Montréal

**REMODELAGE NEURONAL DE LA  
CICATRICE CARDIAQUE SUITE À UN  
INFARCTUS DU MYOCARDE**

Viviane El-Helou

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Doctorat, PhD en Physiologie

Septembre, 2009

Copyright, El-Helou Viviane, 2009

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

Remodelage Neuronal de la Cicatrice Cardiaque  
suite à un Infarctus du Myocarde

Présentée par :

El-Helou Viviane

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Eric Thorin, président-rapporteur

Dr Angelino Calderone, directeur de recherche

Dr Josette Noël, membre du jury

Dr Édith Hamel, examinatrice externe

## RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Suite à un infarctus du myocarde, la formation d'une cicatrice, nommée fibrose de réparation, représente un processus adaptatif et essentiel empêchant la rupture du myocarde. La cicatrice est constituée de myofibroblastes, de cellules vasculaires, de fibres sympathiques ainsi que de cellules souches neuronales cardiaques exprimant la nestine. Une perturbation au niveau de ces constituants cellulaires résulte en une formation maladaptative de la cicatrice et éventuellement, une diminution de la fonction cardiaque. La compréhension des événements cellulaires ainsi que les mécanismes sous-jacents participant à cette fibrose est alors d'une importance primordiale. Cette thèse est axée sur l'identification du rôle du système sympathique et des cellules souches neuronales cardiaques exprimant la nestine dans la formation de la cicatrice ainsi que leur interaction potentielle. Nos travaux examinent l'hypothèse que les cellules souches neuronales exprimant la nestine sont endogènes au cœur et que suite à un dommage ischémique, elles contribuent à la réponse angiogénique et à la réinnervation sympathique du tissu lésé.

Les cellules souches neuronales exprimant la nestine sont retrouvées dans les cœurs de différentes espèces incluant le cœur infarci humain. Elles sont résidentes dans le cœur, proviennent de la crête neurale lors du développement et sont intercalées entre les cardiomyocytes n'exprimant pas la nestine. Suite à leur isolation de cœurs infarcis de rats, les cellules souches neuronales cardiaques prolifèrent sous forme de neurosphères et, dans des conditions appropriées *in vitro*, se différencient en neurones exprimant le neurofilament-M. Suite à un infarctus du myocarde, les niveaux de l'ARNm de nestine sont significativement augmentés au niveau de la

région infarctée et non-infarctée. Nos résultats suggèrent que cette augmentation de l'expression de nestine dans la cicatrice reflète en partie la migration des cellules souches neuronales cardiaques exprimant la nestine de la région non-infarctée vers la région infarctée. Lors de la fibrose de réparation, ces cellules représentent un substrat cellulaire pour la formation de nouveaux vaisseaux et contribuent aussi à la croissance des fibres sympathiques dans la région infarctée.

Finalement, nous démontrons que la formation de la cicatrice est associée à une innervation sympathique de la région infarctée et péri-infarctée. De plus, les fibres sympathiques présentes dans la région infarctée sont observées à proximité de vaisseaux de petits calibres. Ces données suggèrent indirectement que l'innervation de la cicatrice par les fibres sympathiques peut jouer un rôle dans la réponse angiogénique suite à un infarctus du myocarde. Suite à l'administration du corticostéroïde dexaméthasone, nous détectons un amincissement de la cicatrice, associé à une réduction significative des fibres sympathiques exprimant le neurofilament-M dans la région infarctée et péri-infarctée. La diminution de la densité de ces fibres par le dexaméthasone peut être reliée à une diminution de la prolifération des myofibroblastes et de la production de l'ARNm du facteur neurotrophique nerve growth factor.

**Mots clés:** cœur, infarctus du myocarde, cellule souche neuronale, nestine, neurofilament, fibre sympathique, angiogenèse, fibrose, crête neurale, myofibroblaste.

## GENERAL ABSTRACT

Following myocardial infarction, scar formation represents an adaptive response required to heal the damaged myocardium and prevent cardiac rupture. Infarct healing requires the coordinated action of scar myofibroblasts, angiogenic cells, sympathetic fibres and nestin positive cardiac neural stem cells. A perturbation of one or more of the aforementioned events could lead to inadequate scar healing and further worsening of ventricular function. A better understanding of the cellular events and the underlying mechanisms involved in scar formation is of a primordial importance. The focus of the following studies consists of elucidating the role of the sympathetic system and cardiac neural stem cells during scar healing and their potential interaction. We tested the hypothesis that nestin positive neural stem cells are endogenous to the heart, contribute to angiogenesis and sympathetic innervation of the infarcted myocardium following ischemic injury.

Nestin positive cardiac neural stem cells are found in a number of species including the infarcted human heart. Nestin positive cardiac neural stem cells represent a resident population in the heart, are derived from the neural crest and detected intercalated between nestin negative cardiac myocytes. Following their isolation from the infarcted rat heart, neural stem cells proliferate as a neurosphere and under appropriate *in vitro* conditions differentiate to a neurofilament-M immunoreactive neuron. Following myocardial infarction, nestin mRNA levels are significantly elevated in the viable left ventricle and infarct region. Our data further suggests that the increased expression of nestin in the infarct region reflects in part the migration of these neural stem cells from the viable myocardium. During cardiac

wound healing, neural stem cells may represent a novel substrate for *de novo* blood vessel formation and further contribute to sympathetic fibre growth and innervation of the infarct region.

Lastly, we demonstrate that scar formation and healing is associated with sympathetic fibre sprouting of the peri-infarct/infarct region. In addition, sympathetic fibres in the infarct region were detected in close proximity to small calibre blood vessels. These latter data indirectly suggest that innervating sympathetic fibres may play a role in angiogenesis during cardiac wound healing. Following the administration of the corticosteroid dexamethasone inadequate scar healing was observed and associated with a significant reduction of neurofilament-M immunoreactive fibres in the peri-infarct/infarct region. The loss of sympathetic fibre sprouting in the scar may be related to a dexamethasone-mediated suppression of myofibroblast growth and the concomitant reduction of nerve growth factor mRNA expression.

**Key words:** heart, myocardial infarction, neural stem cell, nestin, neurofilament, sympathetic fibre, angiogenesis, fibrosis, neural crest, myofibroblast.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ GÉNÉRAL .....	iii
GENERAL ABSTRACT .....	v
FIGURES et TABLES .....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiv
REMERCIEMENTS .....	xvi
AVANT-PROPOS.....	1
Chapitre 1 INTRODUCTION .....	3
I. CARDIOGENÈSE; ORIGINE DES CELLULES CARDIAQUES .....	4
1. Mésoderme .....	6
2. Ectoderme.....	9
3. Endoderme.....	10
II. LE CŒUR ADULTE.....	11
1. Anatomie, structure et fonction .....	11
2. Composition cellulaire .....	13
2.1 Les cardiomyocytes.....	13

2.1.1 Potentiel régénératif des cardiomyocytes.....	14
2.2 Les fibroblastes cardiaques.....	17
III. INFARCTUS DU MYOCARDE .....	19
1. Étiologie .....	20
2. Caractéristiques générales de l'infarctus du myocarde chez le rat.....	23
3. Région non ischémique .....	24
3.1 Fibrose de réaction .....	24
3.2 Hypertrophie cardiaque .....	25
4. Région ischémique .....	27
4.1 Mort cellulaire .....	27
4.2 Inflammation .....	28
4.3 Fibrose de réparation.....	30
4.3.1 Composition cellulaire de la cicatrice cardiaque.....	31
4.3.1.1 Les myofibroblastes.....	31
4.3.1.1.A Caractéristiques des myofibroblastes .....	32



4.3.1.1.B Facteurs contrôlant la croissance et la fonction des myofibroblastes .....	32
4.3.1.2 L'innervation sympathique de la cicatrice cardiaque .....	36
4.3.1.2.A Le rôle de l'innervation sympathique dans le remodelage cicatriciel suite à un dommage .....	38
4.3.1.3 L'angiogenèse .....	41
4.3.1.4 Les cellules nestine positives de la cicatrice cardiaque (Neural-like stem cells) .....	42
4.3.1.4.A Définition et caractéristiques des cellules souches .....	47
4.3.1.5 Les cellules souches neuronales nestine positives du système nerveux central .....	48
4.3.1.5.A Filaments intermédiaires .....	52
4.3.1.6 Les cellules souches neuronales nestine positives du système nerveux périphérique; cellules progénitrices de la peau .....	55
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....	58
Chapitre 2 PRÉSENCE DE CELLULES SOUCHES NEURONALES NESTINE POSITIVES DANS LE MYOCARDE NORMAL ET ENDOMMAGÉ DE RATS .....	61
Chapitre 3 RÔLE DES CELLULES SOUCHES NEURONALES NESTINE POSITIVES DANS L'INNERVATION SYMPATHIQUE ET L'ANGIOGENESE SUITE À UN INFARCTUS DU MYOCARDE .....	96
Chapitre 4 LE TRAITEMENT AVEC LE GLUCOCORTICOIDE DEXAMETHASONE ATTÉNUÉ L'INNERVATION SYMPATHIQUE DE LA CICATRICE .....	141
Chapitre 5 DISCUSSION .....	180

I. Sommaire des nouvelles découvertes.....	181
II. Importance physiologique des résultats présentés dans cette thèse .....	184
1. Caractérisation des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques .....	186
1.1 Phénotype et Distribution des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques .....	186
1.2 Origine des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques .....	187
2. Expression du filament intermédiaire nestine dans le cœur endommagé.....	189
3. Rôle des cellules souches neuronales nestine positives dans le remodelage ventriculaire suite à un infarctus du myocarde .....	193
4. Interaction entre les différents événements cellulaires lors du remodelage cicatriciel.....	200
5. Les cellules souches neuronales et la thérapie régénératrice.....	205
Chapitre 6 CONCLUSION et PERSPECTIVES .....	208
BIBLIOGRAPHIE .....	213
ANNEXE .....	234

# FIGURES et TABLES

## CHAPITRE 1

FIGURE 1. ORIGINE MÉSODERMIQUE DU CŒUR.....	5
FIGURE 2. DÉVELOPPEMENT DU CŒUR.....	8
FIGURE 3. COUPE FRONTALE DU CŒUR ET REPRÉSENTATION DE SA PAROI .....	12
FIGURE 4. VISUALISATION DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES DE RATS PAR MICROSCOPIE CONFOCALE.....	15
FIGURE 5. MARQUAGE DES CARDIOMYOCYTES EN DIVISION SUITE À UN INFARCTUS DU MYOCARDE .....	16
FIGURE 6. VISUALISATION DES CELLULES CARDIAQUES DU MYOCARDE VENTRICULAIRE DE LAPIN PAR MICROSCOPIE CONFOCALE .....	18
FIGURE 7. SCHÉMA REPRÉSENTANT LE DÉVELOPPEMENT DE LA PLAQUE ATHÉROSCLÉROTIQUE .....	21
FIGURE 8. MARQUAGE AU ROUGE SIRIUS DU COLLAGÈNE TYPE I .....	36
FIGURE 9. MARQUAGE DES MYOFIBROBLASTES DÉRIVÉS DE CICATRICES CARDIAQUES DE RATS.....	35
FIGURE 10. VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE DES FIBRES SYMPATHIQUES AU NIVEAU DE LA CICATRICE CARDIAQUE ET DE LA RÉGION PÉRI-INFARCTÉE .....	40
FIGURE 11. CULTURE CELLULAIRE DE CICATRICES CARDIAQUES DE RATS .....	45
FIGURE 12. PRÉSENCE DE NESTINE AU NIVEAU DU CŒUR DE RATS SUITE À UN INFARCTUS DU MYOCARDE.....	46
FIGURE 13. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES CLASSES DE CELLULES SOUCHES POSSÉDANT UN POTENTIEL DE DIFFÉRENCIATION NEURONALE.....	50

FIGURE 14. FORMATION DE NEUROSPHÈRES PAR DES CELLULES SOUCHES NEURONALES .....	51
--	----

FIGURE 15. LOCALISATION DES CELLULES SOUCHES NEURONALES DÉRIVÉES DE LA CRÊTE NEURALE .....	57
--	----

## Chapitre 2

FIGURE 1. GRAFTED GFP <sup>(+)</sup> BONE MARROW CELLS IN THE INFARCT REGION, NESTIN AND C-KIT STAINING IN THE NORMAL MYOCARDIUM. ....	90
--	----

FIGURE 2. NESTIN <sup>(+)</sup> NEURAL-LIKE STEM CELLS ISOLATED FROM THE NORMAL MYOCARDIUM AND IMMUNOREACTIVITY IN NON-NEURAL CELLS. ....	91
---	----

FIGURE 3. GENE EXPRESSION IN 1 WEEK POST-MYOCARDIAL INFARCT RATS. ....	92
--	----

FIGURE 4. GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN EXPRESSION IN NESTIN <sup>(+)</sup> NEURAL-LIKE STEM CELLS. ....	93
--	----

FIGURE 5. NESTIN FIBRE-LIKE STRUCTURES DETECTED IN THE NORMAL AND INFARCTED MYOCARDIUM. ....	94
--	----

TABLE 1. HEART WEIGHT AND CONTRACTILE FUNCTION. ....	95
--	----

## Chapitre 3

FIGURE 1. NESTIN-EXPRESSING CELLS IN THE HEART. ....	129
--	-----

FIGURE 2. NESTIN-EXPRESSING CELLS EXHIBIT A NEURAL STEM CELL PHENOTYPE. ....	130
--	-----

FIGURE 3. NESTIN-EXPRESSING CELLS IN THE INFARCTED HUMAN HEART. ....	131
--	-----

FIGURE 4. NEURAL CREST ORIGIN OF NESTIN-EXPRESSING CELLS. ....	132
--	-----

FIGURE 5. THE PHYSICAL INTERACTION OF NESTIN PROCESSES AND NEUROFILAMENT-M FIBRES. ....	133
---	-----

FIGURE 6. SYMPATHETIC FIBRE DENSITY AND GROWTH FACTOR EXPRESSION IN THE HEART OF 6-HYDROXYDOPAMINE TREATED RATS.....	134
--	-----

FIGURE 7. IN VIVO INJECTION OF CELLS ISOLATED FROM NEUROSPHERES GENERATED FROM PRIMARY PASSAGE SCAR-DERIVED CELLS.....	135
--	-----

FIGURE 8. VESSEL NUMBER AND LUMEN AREA OF DE NOVO BLOOD VESSELS.....	139
--	-----

TABLE 1. REAL-TIME PCR PRIMERS DERIVED FROM THE RAT.....	140
--	-----

## CHAPITRE 4

FIGURE 1. MOLECULAR REMODELLING OF THE NON-INFARCTED LEFT VENTRICLE OF UNTREATED AND DEXAMETHASONE-TREATED POST-MI RATS.....	171
--	-----

FIGURE 2. ANATOMICAL RELATIONSHIP BETWEEN NEUROGENESIS AND ANGIOGENESIS IN THE INFARCT REGION.....	172
--	-----

FIGURE 3. DEXAMETHASONE AND SYMPATHETIC FIBRE INNERVATION OF THE INFARCT REGION.....	173
--	-----

FIGURE 4. SMOOTH MUSCLE $\alpha$ -ACTIN (SM $\alpha$ -ACTIN) AND GAP43 PROTEIN EXPRESSION IN THE INFARCT REGION AND EFFECT OF DEXAMETHASONE (DEX).....	175
--	-----

FIGURE 5. THE EFFECT OF DEXAMETHASONE (DEX) ON NGF mRNA EXPRESSION IN THE INFARCT REGION AND ISOLATED SCAR MYOFIBROBLASTS.....	176
--	-----

FIGURE 6. THE SUPPRESSIVE ACTION OF DEXAMETHASONE ON DNA SYNTHESIS IN ISOLATED SCAR MYOFIBROBLASTS.....	177
---	-----

TABLE 1. BODY AND HEART WEIGHTS OF SHAM AND 1-WEEK POST-MYOCARDIAL INFARCTED RATS AND THE EFFECT OF DEXAMETHASONE (DEX) .....	178
---	-----

TABLE 2. HEMODYNAMIC PARAMETERS OF SHAM AND MYOCARDIAL INFARCTED RATS AND THE EFFECT OF DEXAMETHASONE (DEX) .....	179
---	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-OHDA: 6-hydroxydopamine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BDNF: Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*Brain-derived neurotrophic factor*)

BrdU: Bromodeoxyuridine

Cx: Connexine

DAPI: 4V-6-Diamidino-2-phenylindole

DEX: Dexaméthasone

EGF: Facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor*)

FGF: Facteur de croissance fibroblastique (*Fibroblast growth factor*)

GATA4: GATA binding protein 4

GFAP: Protéine glio-fibrillaire acide (*Glial fibrillary acidic protein*)

GFP: Protéine fluorescente verte (*Green fluorescent protein*)

EGFP: Protéine fluorescente verte performante (*Enhanced Green fluorescent protein*)

IL: Interleukine(s)

MHC: Chaîne lourde de la myosine (*Myosin heavy chain*)

MOSP: Protéine myélinique spécifique aux oligodendrocytes (*Myelin oligodendrocyte specific protein*)

Nestin: Protéine des cellules souches neuroépithéliale (*Neuroepithelial stem cell protein*)

NGF: Facteur de croissance des nerfs (*Nerve growth factor*)

NF: Neurofilament(s)

SERCA: Pompe ATPase calcique du réticulum sarco-endoplasmic (*Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*)

SKPs: Cellules progénitrices de la peau (*Skin progenitor cells*)

SMA-alpha: Actine alpha du muscle lisse

TGF-beta: Facteur de croissance transformant beta (*Transforming growth factor-beta*)

TNF-alpha: Facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumor necrosis factor-alpha*)

VEGF: Facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*)

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, **Dr Angelino Calderone**, pour toutes ces années enrichissantes passées dans son laboratoire. Votre passion pour la recherche est contagieuse et j'en ai bénéficiée pleinement. Je vous remercie pour votre présence continue et la confiance que vous m'avez témoignée.

Je tiens à remercier profondément **Hugues Gosselin** et **Robert Clément** pour leur professionnalisme, le support inconditionnel et la présence continue. Nombreux sont les étudiants qui passent par le labo Calderone, mais il reste que vous êtes le cœur de ce laboratoire.

Merci à mes deux meilleures amies, **Dr Pauline Béguin** et **Cindy Proulx**. J'ai eu le grand plaisir de travailler avec vous. Cindy, merci pour ta détermination et ton amour pour le travail en équipe. Tu as su rendre mes journées de travail plaisantes. Pauline, un merci spécial pour toi. En si peu de temps, tu as réussi à m'apprendre beaucoup. Tu as été mon support moral tout au long de l'écriture de cette thèse. Merci pour la lecture, la correction de cette thèse ainsi que tes suggestions pertinentes. Un grand merci à ta maman aussi pour avoir pris le temps de lire mon introduction.

Un grand merci à **John Assimakopoulos** et **Marc-antoine Gillis** pour l'aide que vous m'avez apportée. **Louis Villeneuve**, je vous remercie pour votre patience. Les heures et les heures que vous avez passées à regarder mes lames d'immunofluorescence étaient évidemment nombreuses.

Je tiens également à remercier les membres du Jury qui ont accepté de juger mon travail: **Dr Eric Thorin**, **Dr Josette Noël** et **Dr Édith Hamel**. Je voudrais aussi remercier les professeurs du département de physiologie et de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui ont contribué à mon apprentissage. Grâce à vos recherches et votre vision, j'ai acquis une base scientifique très solide.

J'aimerais aussi remercier les collaborateurs ainsi que tous les coauteurs qui se sont impliqués dans mes publications. Je remercie les **Instituts de recherche en santé du Canada** pour m'avoir accordée une bourse de formation.



Merci aux membres de **ma famille** et **mes amis**, à ceux et celles qui m'ont encouragée le long de mes études.

Finalement, un énorme merci à mon mari **Elie** pour son amour et son support continu. Merci à mes enfants, **Cynthia et Kevin**, qui sont la source de mon courage et de ma détermination.

*Avec gratitude et amour,*

*Je dédie cette thèse à mon Mari et mes enfants,*

*Grâce à eux, tout est possible.*

## AVANT-PROPOS

Suite à un infarctus du myocarde, la formation de la cicatrice cardiaque représente une réponse physiologique essentielle pour le maintien de l'intégrité du myocarde. Ce processus est nommé fibrose de réparation et plusieurs événements cellulaires y sont associés. Tout d'abord, les myofibroblastes, issus de la transdifférenciation des fibroblastes cardiaques, envahissent le tissu lésé et sont responsables de l'augmentation des niveaux de collagène. Ensuite, de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés (angiogenèse) afin d'alimenter et d'oxygéner les composantes cellulaires. La région infarctée est aussi réinnervée par des fibres sympathiques. La contribution de l'innervation sympathique dans la formation de la cicatrice cardiaque est méconnue. Les études au niveau de la cicatrice cutanée démontrent que l'innervation sympathique régule la prolifération des myofibroblastes et l'angiogenèse. Récemment, notre laboratoire a été le premier à identifier des cellules possédant une morphologie neuronale et exprimant le filament intermédiaire nestine. Le rôle de ces cellules nestine positives dans le remodelage cicatriciel cardiaque est indéterminé. Au niveau du système nerveux central et périphérique, il a été démontré que les cellules souches neuronales nestine positives sont impliquées dans la réponse angiogénique. De plus, au niveau du muscle squelettique dénervé, les fibres nestine positives peuvent jouer un rôle dans la croissance axonale. Les données recueillies par notre groupe jusqu'à présent suggèrent que les cellules nestine positives identifiées dans le cœur semblent posséder des caractéristiques analogues aux cellules souches neuronales nestine positives du cerveau, aux cellules nommées "side population" du cœur et aux cellules progénitrices nestine positives de la peau.

Ces trois types cellulaires, originaires de la crête neurale, participent chez l'adulte à la réparation tissulaire suite à un dommage. Plus spécifiquement, elles se différencient en cellules neuronales et gliales. De plus, elles se différencient en cellules endothéliales et/ou musculaires lisses favorisant de cette manière la réponse angiogénique.

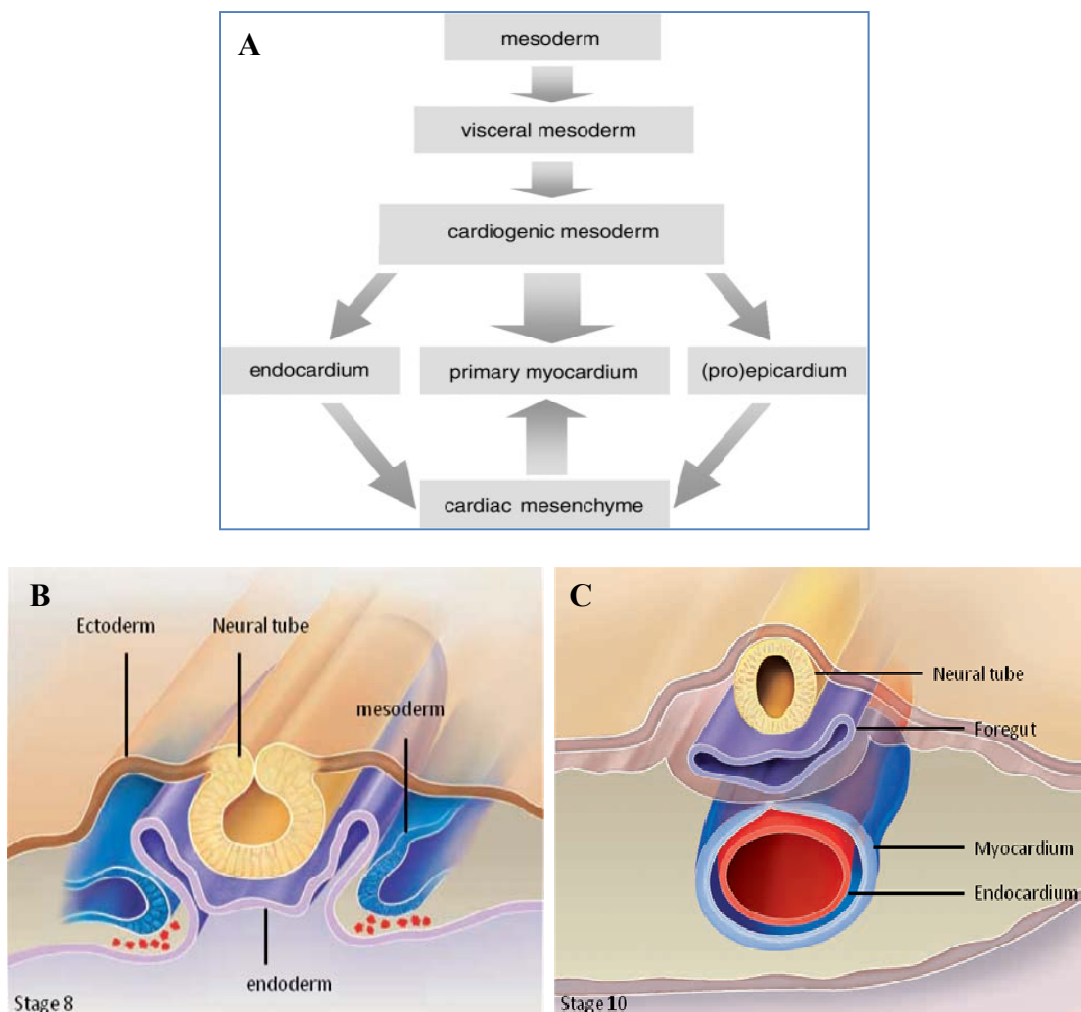
La découverte des cellules nestine positives représente un nouvel aspect du remodelage cicatriciel et soulève plusieurs interrogations. Ainsi, le but général de nos recherches est d'approfondir nos connaissances sur les cellules nestine positives et ce, à plusieurs niveaux. Premièrement, en plus de l'expression de nestine, ces cellules possèdent-elles d'autres caractéristiques communes aux cellules souches neuronales? Deuxièmement, la détermination de l'origine de ces cellules est fondamentale, sont-elles des cellules endogènes au cœur ou proviennent-elles de sources extracardiaques? Troisièmement, l'évaluation de la contribution de ces cellules dans le remodelage cicatriciel est nécessaire. Représentent-elles un événement obligatoire de la fibrose de réparation? Nous examinerons ainsi deux rôles potentiels de ces cellules au niveau de l'angiogenèse et de la réinnervation sympathique de la cicatrice. Finalement, la présence des cellules nestine positives contribue à la complexité du remodelage cicatriciel. Existe-il alors une interaction entre ces cellules et les autres composantes cellulaires?

Les études présentées dans cette thèse ont été élaborées pour répondre à ces questions. Elles soulignent l'importance de l'innervation sympathique ainsi que de la nouvelle population de cellules nestine positives dans la formation de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde.

# **Chapitre 1 INTRODUCTION**

# **I. CARDIOGENÈSE; ORIGINE DES CELLULES CARDIAQUES**

La cardiogenèse chez les rongeurs est similaire à celles des oiseaux et des amphibiens. Les données recueillies au niveau des études de développement chez ces deux derniers groupes d'animaux permettent alors l'extrapolation au niveau des mammifères. Cependant, il existe des petites variations temporelles durant la formation des structures (Fishman MC et Chien KR, 1997; Moorman AF et Christoffels VM, 2003). Les sections suivantes résument la contribution des trois couches germinales soient l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme dans la cardiogenèse. L'origine des différents types cellulaires retrouvés au niveau du cœur adulte est aussi soulignée (Figure 1).



### **Figure 1. Origine mésodermique du cœur**

(A) Le cœur est formé majoritairement à partir du mésoderme qui est responsable de la formation de l'endocarde, du myocarde et de l'épicarde. (B) et (C) Coupe transversale d'un embryon de poulet (stade 8 et 10). Les trois couches germinales sont représentées schématiquement. L'ectoderme devient la plaque neurale qui se plie pour donner le tube neural. Le mésoderme génère le cœur et l'endoderme forme la partie antérieure du tube digestif (foregut) ((A) Tiré de Moorman AF et Christoffels VM, 2003; (B) Tiré et adapté de Fishman MC et Chien KR, 1997).

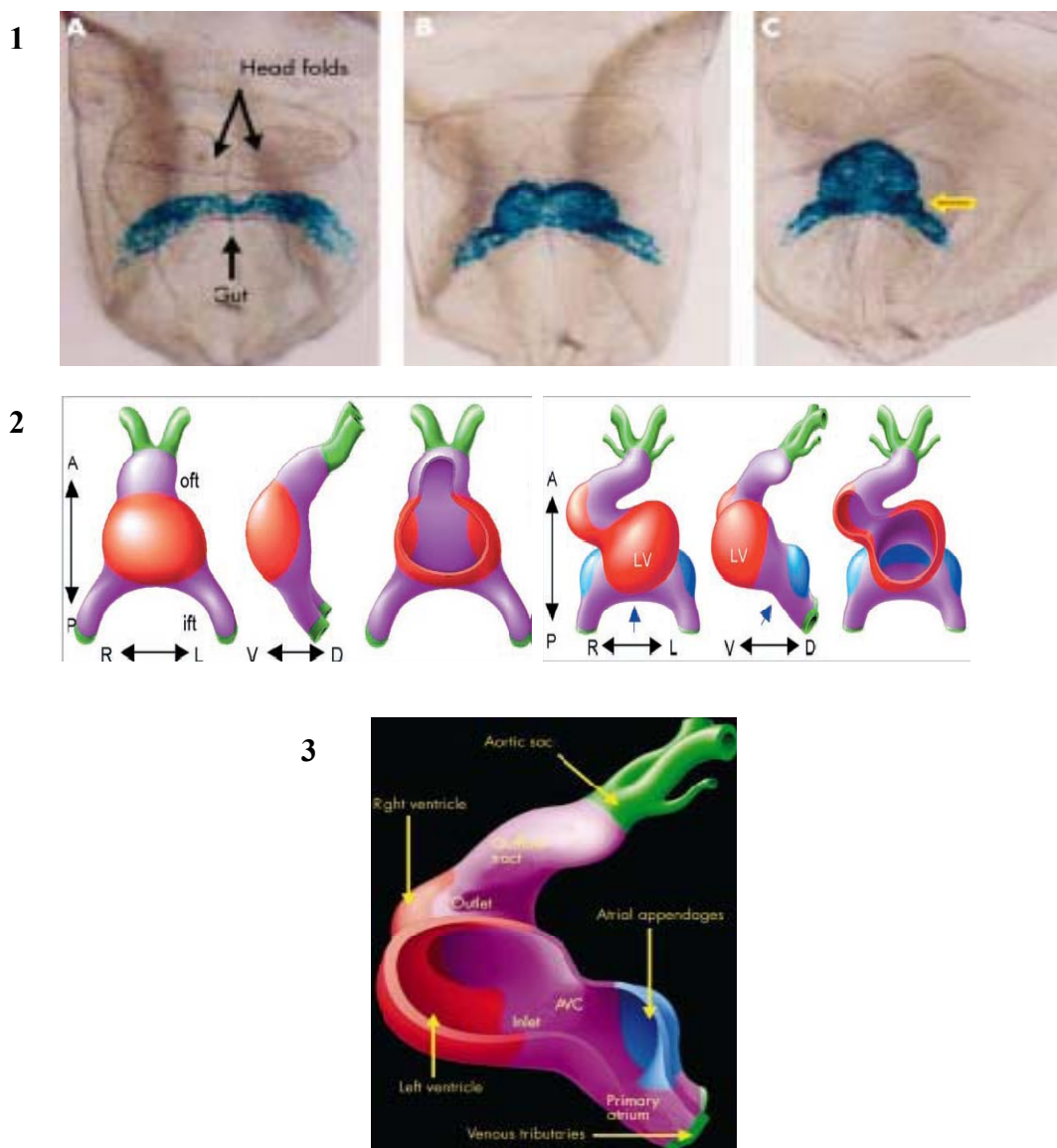
# 1. Mésoderme

Le cœur est formé principalement à partir des cellules cardiogéniques du mésoderme (Figure 1). Ces cellules forment des plaques cardiaques qui migrent centralement du côté ventral de l'embryon afin de former un tube linéaire (Moorman AF et Christoffels VM, 2003). Ce mésoderme cardiogénique est composé de trois couches. D'abord, l'endocarde qui représente la couche endothéliale du cœur. Ensuite, le myocarde qui est la source des cardiomyocytes. Finalement, l'épicarde qui génère les fibroblastes cardiaques interstitiels ainsi que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des artères coronaires (Poelmann RE et al., 2002; Moorman A et al., 2003; Lie-Venema H et al., 2007).

Au début de sa formation, la structure tubulaire du cœur détient la forme d'un Y inversé et sa fonction circulatoire est simplifiée à la présence de deux côtés représentant le débit entrant ("*inflow*", côté caudal générant les oreillettes et le sinus veineux) ainsi que le débit sortant ("*outflow*", côté rostral générant les ventricules et le cône artériel) (Figure 2). Afin d'obtenir une morphologie à quatre compartiments d'un cœur adulte, l'axe antéro-postérieur est déterminé et le tube cardiaque passe par plusieurs étapes consistant en une élongation et un élargissement de cette structure. L'élongation se fait par la formation de nouveaux cardiomyocytes, soit par la croissance des cardiomyocytes existants dans le mésenchyme (processus de myocardialisation) soit par le recrutement et la différenciation de cellules non cardiaques mésenchymateuses en cardiomyocytes (Kruithof BP et al., 2003a; Kruithof BP et al., 2003b). En parallèle, des séries coordonnées de nœuds



(pliage/looping) ont lieu modifiant ainsi la morphologie du tube (Moorman AF et Christoffels VM, 2003). Ces étapes complexes de la morphogenèse cardiaque ne seront pas détaillées dans ce travail. Il est cependant intéressant de noter que l'ensemble de ces changements morphologiques est dicté par des variations génotypiques résultant de l'activation ou de l'inactivation de plusieurs voies de signalisation à des moments précis au cours du développement (Fishman MC et Chien KR, 1997; Rosenthal N et Xavier-Neto J, 2000; Xavier-Neto J et al., 2001; Waldo KL et al., 2001).



## **Figure 2. Développement du cœur**

(1) Vue ventrale de la structure en Y inversé marquant le début de la formation du cœur observée chez des embryons de souris (Panneaux A à C représentent les stades à 4, 6 et 8 somites respectivement). Le myocarde est montré en bleu utilisant le transgène rapporteur de la protéine myosine à chaîne légère (*Tiré de Moorman A et al, 2003*). (2) et (3) Représentation schématique simplifiée (vue droite (R) et gauche (L) ainsi que vue ventrale (V) et dorsale (D)) des régions inflow (ift) et outflow (oft). Le tube cardiaque linéaire subit une série de pliages menant à la formation des quatre chambres cardiaques ainsi qu'un réarrangement de la position et de l'orientation des différentes structures (ventricule gauche (LV)) (*Tiré et adapté de Moorman AF et Christoffels VM, 2003*).

## 2. Ectoderme

L'ectoderme est surtout destiné à la formation de la plaque neurale qui deviendra le tube neural. Il participe aussi à la formation du cœur et ce, par les cellules dérivées de la crête neurale. Au niveau du système nerveux périphérique, ces cellules génèrent les neurones et les cellules gliales (Anderson DJ, 1994). Elles jouent aussi un rôle actif et essentiel dans la formation du cœur tel que déterminé par les études d'ablation de la crête neurale cardiaque où il résulte une perturbation de la morphogenèse cardio-vasculaire (Kirby ML et al., 1983; Kirby ML et Waldo KL, 1990). Ces cellules migrent à partir du tube neural et participent principalement à la division normale du "*outflow tract*" formant ainsi le septum aorto-pulmonaire du pôle artériel du cœur (Kirby ML et Waldo KL, 1995; Poelmann RE et al., 1998; Waldo K et al., 1999; Jiang X et al., 2000). Avant cette division, le ventricule pompe le sang dans un seul vaisseau qui est le "*outflow tract*" cardiaque. Au cours du développement, le remodelage (division) de ce vaisseau génère deux vaisseaux, l'aorte ascendante et l'artère pulmonaire. Simultanément, il y a un remodelage du canal auriculo-ventriculaire et une fermeture du septum ventriculaire. Ainsi, l'aorte devient connectée avec le ventricule gauche et l'artère pulmonaire avec le ventricule droit. Les cellules dérivées de la crête neurale cardiaque jouent aussi un rôle dans la formation des artères de l'arche aortique ainsi que les valves semi-lunaires.

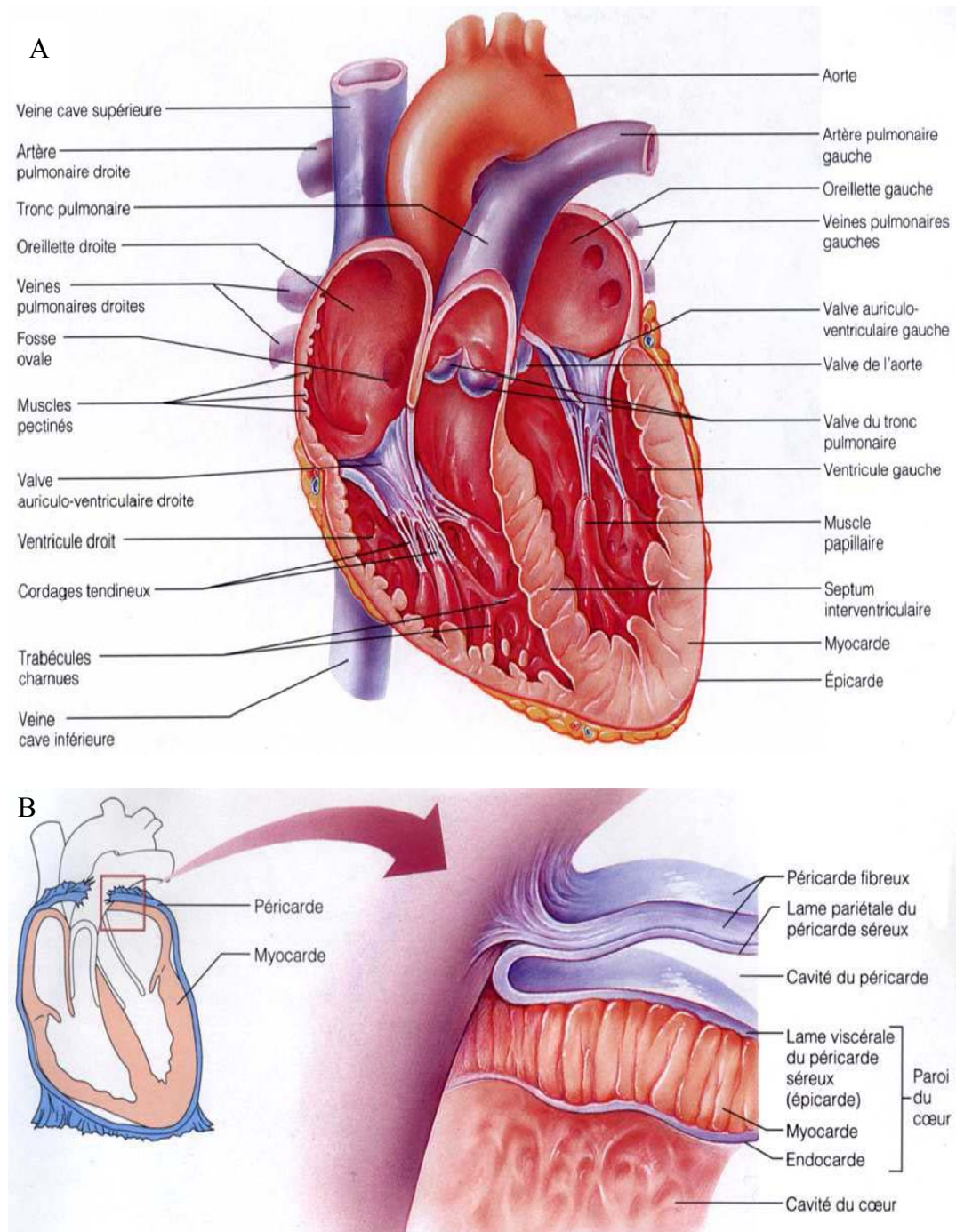
### **3. Endoderme**

L'endoderme joue un rôle régulateur dans la spécification des cellules du mésoderme vers la lignée cardiomyogénique ainsi que dans leur différenciation en cardiomyocytes. La spécification est définie comme étant le processus par lequel des cellules naïves sont engagées dans un type de lignée cellulaire quelconque conduisant à l'apparence d'un type cellulaire définitif (Schultheiss TM et al., 1995; Arai A et al., 1997; Fishman MC et Chien KR, 1997; Lough J et Sugi Y, 2000).

## **II. LE CŒUR ADULTE**

### **1. Anatomie, structure et fonction**

Le cœur est un organe musculaire responsable de la circulation du sang à travers l'organisme grâce à la contraction rythmée et répétée de ses quatre cavités, les deux oreillettes et les deux ventricules. Le cœur est enveloppé dans un sac fibreux nommé péricarde. Sa paroi est formée de trois tuniques soient l'épicarde, le myocarde et l'endocarde (Figure 3). Le tissu cardiaque est composé d'un syncytium de cellules musculaires interconnectées permettant le passage rapide du flux électrique d'une cellule à l'autre. La contraction des cardiomyocytes est déclenchée par une dépolarisation membranaire générée au niveau du nœud sinusal (sino-auriculaire) de l'oreillette droite. Le nœud sinusal est constitué d'un groupe de cellules appelées pacemaker qui déclenchent un potentiel d'action (dépolarisation cellulaire) qui se propage dans l'oreillette conduisant à la contraction de cette dernière. Par la suite, l'influx électrique arrive au nœud auriculo-ventriculaire et il se propage au niveau du système de conduction ventriculaire composé des faisceaux de His (droit et gauche) ainsi que des fibres de Purkinje. Ce réseau transmet l'impulsion électrique aux ventricules, amenant à la dépolarisation du tissu et à sa contraction.



### **Figure 3. Coupe frontale du cœur et représentation de sa paroi**

(A) Représentation schématique de l'anatomie du cœur montrant principalement les différentes cavités, les valves ainsi que les principaux vaisseaux. (B) Représentation schématique de la paroi du cœur qui est constituée de l'épicarde, du myocarde et de l'endocarde (*Tiré et adapté de Marieb, 1993*).

## **2. Composition cellulaire**

Le cœur normal est principalement composé de deux types cellulaires: les cardiomyocytes et les fibroblastes. Le tissu cardiaque est aussi occupé par d'autres cellules non myocytaires notamment les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Au niveau ventriculaire, les cellules non myocytaires constituent 75% du nombre cellulaire et les fibroblastes occupent 90% à 95% de la masse cellulaire. En parallèle, les cardiomyocytes constituent 25% du nombre cellulaire et environ 75% du volume ventriculaire (Jugdutt BI, 2003).

### **2.1 Les cardiomyocytes**

Les cardiomyocytes sont les cellules striées contractiles du cœur (Figure 4). Ces cellules possèdent une activité électrique intrinsèque aboutissant à la contraction du muscle cardiaque. Ils sont interconnectés par des jonctions intercellulaires spécialisées appelées jonctions lacunaires (jonctions GAP) servant à assurer la conduction rapide du flux électrique entre les cellules (Gourdie RG et al., 1991). Les jonctions GAP sont situées au niveau des disques intercalaires et elles sont principalement constituées chez les mammifères d'un assemblage de six protéines transmembranaires nommées connexine (Cx) 43 (Beyer EC et al., 1987; Hervé JC et al., 2008). Le cardiomyocyte comporte des unités contractiles appelées sarcomères qui sont composés de filaments d'actine et de myosine. L'interaction entre ces protéines produit un raccourcissement du sarcomère, ce qui conduit à la contraction

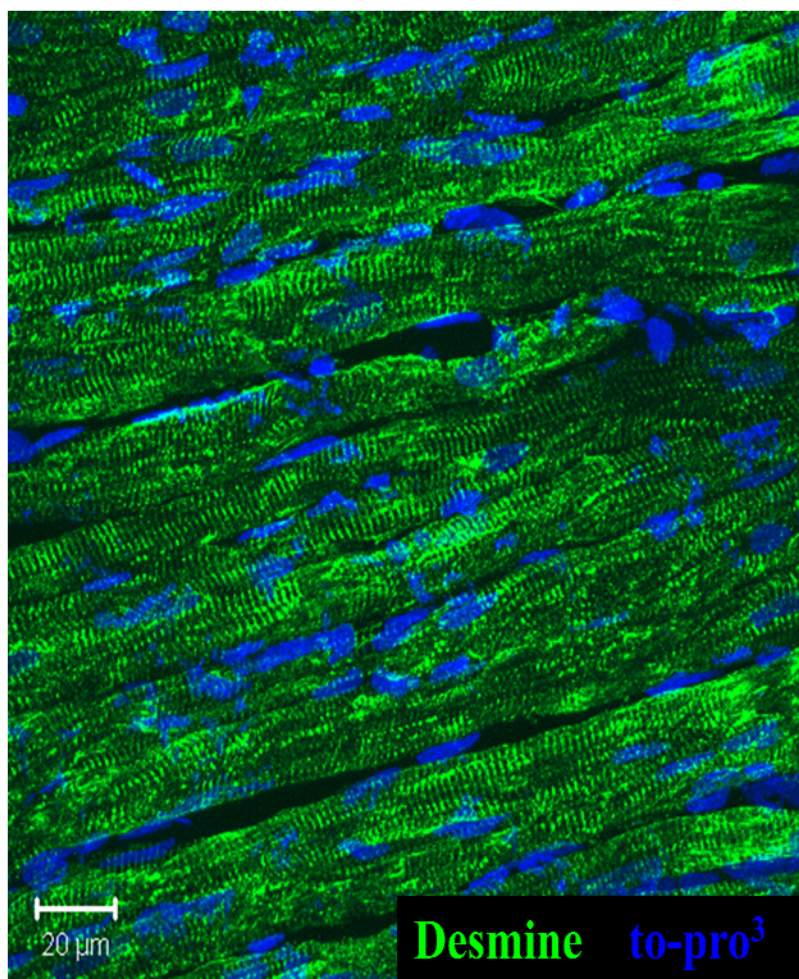
cellulaire (Walker CA et Spinale FG, 1999). Les marqueurs spécifiques des cardiomyocytes sont la Cx43, la desmine et l'actine alpha sarcomérique (Lazarides E et Hubbard BD, 1976; Gunning P et al., 1983; Fromaget C et al., 1992).

### 2.1.1 Potentiel régénératif des cardiomyocytes

Pendant plusieurs années, la communauté scientifique a considéré le cardiomyocyte comme une cellule différenciée de façon terminale, soit sans potentiel mitotique (Anversa P et al., 1996a; Anversa P et al., 1996b). La différenciation de façon terminale est basée sur deux aspects. Premièrement, un retrait permanent du cycle de division cellulaire. Deuxièmement, une régulation à la hausse d'un ensemble de gènes spécifiques pour le tissu concerné (Ahuja P et al., 2007). Plusieurs études datant du début des années 90 ont défié ce dogme en montrant que le cardiomyocyte possède la capacité de se diviser. L'idée d'une division cellulaire au niveau d'une sous population de cardiomyocytes est devenue de plus en plus populaire grâce à l'usage de plusieurs techniques de visualisation. La division du cardiomyocyte est observée dans le cœur normal chez l'homme et les animaux ainsi que dans différentes conditions pathologiques telles que l'infarctus du myocarde (Figure 5), l'insuffisance cardiaque et la sténose aortique (Kajstura J et al., 1994; Anversa P et al., 1996b; Anversa P et Kajstura J, 1998; Kajstura J et al., 1998; Beltrami AP et al., 2001). Ce faible taux de prolifération des cardiomyocytes sert ainsi à compenser la mort cellulaire qui a lieu continuellement "*cell turnover*" durant

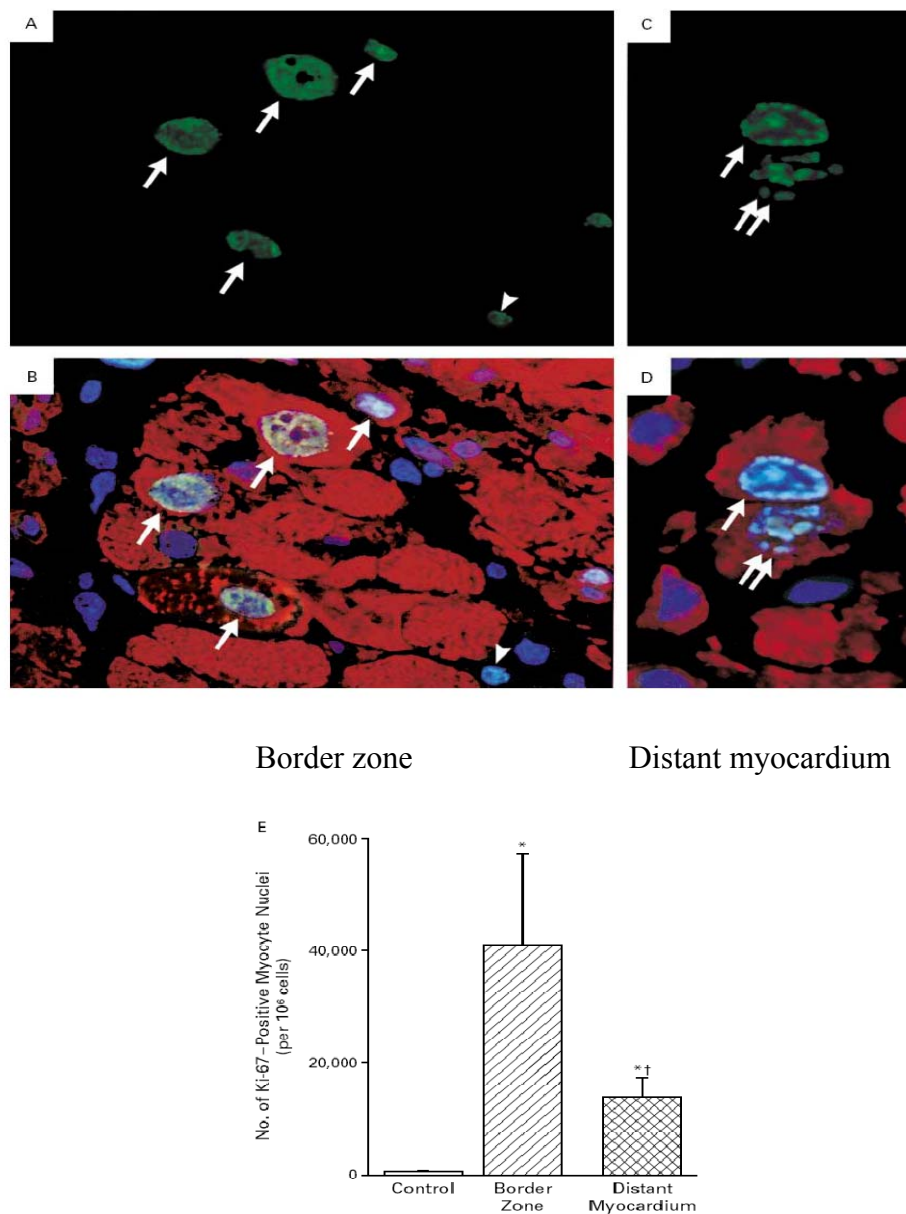


la vie de l'organisme. Par contre, il représente un mécanisme inadéquat pour la réparation cardiaque suite à un dommage (Ahuja P et al., 2007).



**Figure 4. Visualisation des cardiomyocytes ventriculaires de rats par microscopie confocale**

Les cardiomyocytes sont immunopositifs au filament intermédiaire desmine (vert). Les noyaux sont marqués avec le to-pro<sup>3</sup> (bleu). Le to-pro<sup>3</sup> est un marqueur spécifique nucléaire qui s'intercale entre les bases de l'acide désoxyribonucléique (*résultat non publié du laboratoire*).



### **Figure 5. Marquage des cardiomyocytes en division suite à un infarctus du myocarde**

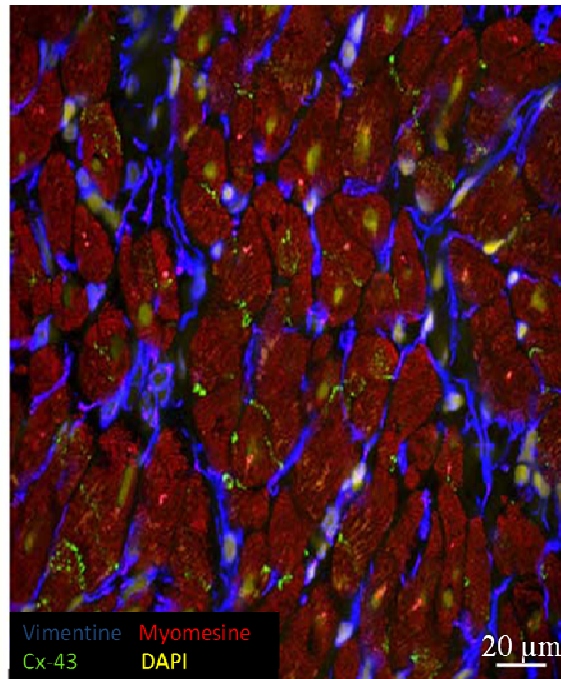
(A-D) Présence dans le cœur endommagé (border zone et distant myocardium) de cardiomyocytes positifs à l'actine alpha sarcomérique (rouge) et au Ki-67 (vert) qui est un antigène nucléaire présent dans toutes les phases du cycle de division sauf la phase G0. Le noyau est détecté par un marquage au propidium iodide (bleu). (E) Dans le cœur endommagé, le nombre de noyaux de cardiomyocytes positifs au Ki-67 augmente de façon significative dans la région péri-infarctée (border zone) du myocarde ainsi que dans le myocarde viable (distant myocardium) (*Tiré de Beltrami AP et al., 2001*).

## 2.2 Les fibroblastes cardiaques

Ces cellules jouent un rôle structural et mécanique en étant les principaux producteurs des protéines de la matrice extracellulaire en contribuant notamment à la synthèse et à la sécrétion des collagènes de type I, III, IV et VI, de la fibronectine et de la laminine (Eghbali M et al., 1989; Camelliti P et al., 2005). Dans le cœur normal, environ 80% du collagène total produit est le collagène de type I tandis que le collagène de type III représente environ 15%-20% (Bashey RI et al., 1992). La synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire sont des processus hautement régulés impliquant la présence de différentes protéines (Vanhoutte D et al., 2006). La matrice extracellulaire consiste en un réseau de fibres assurant l'intégrité structurale du tissu par le maintien de l'alignement des cardiomyocytes et des vaisseaux et elle prévient aussi le glissement (*slippage*) des cardiomyocytes durant la contraction. De plus, elle possède un rôle fonctionnel dans la transduction de la force de contraction durant la systole (Camelliti P et al., 2005). Récemment, il a été montré que les fibroblastes jouent aussi un rôle dans le couplage électrique en exprimant la Cx40 et la Cx45 (Camelliti P et al., 2004). Les marqueurs les plus utilisés pour l'identification des fibroblastes sont la vimentine (Figure 6) et le récepteur tyrosine kinase à domaine discoidine (DDR 2) (Shrivastava A et al., 1997; Goldsmith EC et al., 2004; Camelletti P et al., 2005).

Les fibroblastes participent activement au remodelage cardiaque par la sécrétion de plusieurs facteurs comme le transforming growth factor-beta (TGF-beta), l'angiotensine II, l'endothéline-1 et le tumor necrosis factor (TNF). Ces

facteurs induisent l'hypertrophie des cardiomyocytes ainsi que la production excessive des protéines de la matrice extracellulaire (MacKenna D et al., 2000) (voir section 3.1 et 3.2).



**Figure 6. Visualisation des cellules cardiaques du myocarde ventriculaire de lapin par microscopie confocale**

Les cardiomyocytes sont marqués avec des anticorps anti-myomesin (rouge) et anti-connexine 43 (vert). Les fibroblastes positifs pour la vimentine (bleu) occupent l'espace interstitiel. Les noyaux sont marqués avec le 4V-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (jaune verdâtre). L'échelle représente 20 μm (*Tiré et adapté de Camelliti P et al., 2005*).

### **III. INFARCTUS DU MYOCARDE**

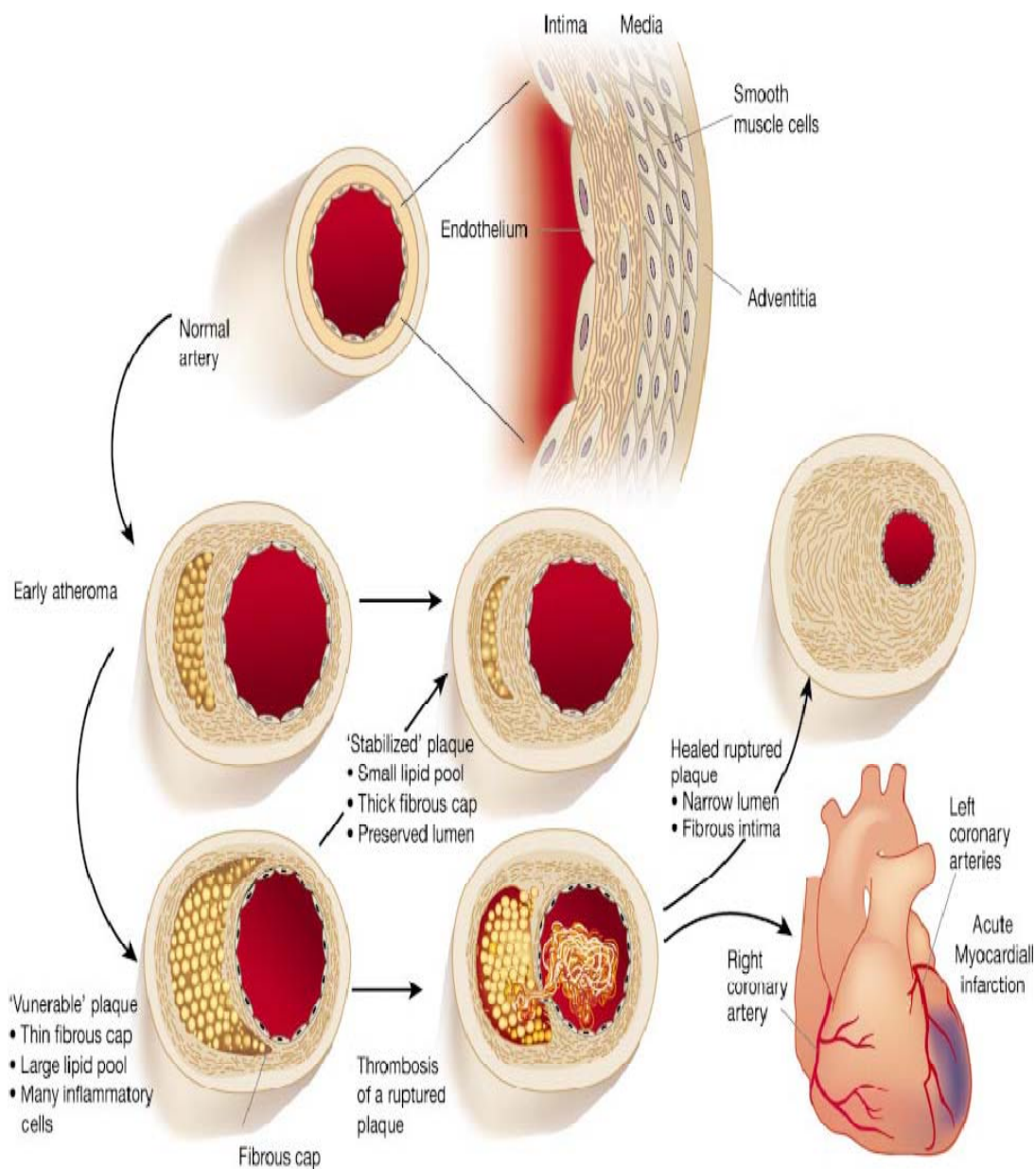
Au Canada, les maladies cardiovasculaires constituent une des principales causes de décès (32,1%). De plus, elles sont la principale cause d'hospitalisation chez les hommes (19,8%) et les femmes (14,0%). La prévalence des maladies cardiovasculaires augmente principalement avec l'âge mais plusieurs facteurs de risque prédisposent aussi l'individu notamment le tabagisme, la sédentarité, l'obésité, l'hypertension, la dyslipidémie et le diabète. Parmi les maladies cardiovasculaires, une proportion importante de la mortalité est attribuable à l'infarctus du myocarde (8,0%) (Statistique Canada, 2009).

L'infarctus du myocarde est provoqué par le blocage partiel ou complet de la circulation sanguine au niveau d'une artère coronaire. Ceci résulte en une hypoxie de la région desservie par cette artère et provoque un dommage tissulaire irréversible. Par conséquent, trois régions peuvent être distinguées dans le myocarde: la région infarctée (région cicatricielle touchée par l'hypoxie), la région péri-infarctée (région entourant la région infarctée) et la région non infarctée (région non hypoxique).

# **1. Étiologie**

L'infarctus du myocarde est principalement causé par les maladies coronariennes. Le fonctionnement normal des artères coronaires assure un débit sanguin adéquat et par le fait même, un apport en nutriments et une oxygénation normale du tissu cardiaque. Par conséquent, les changements fonctionnels et structurels au niveau des coronaires aboutissent à une réduction ou à un blocage du flot sanguin et ultimement à un infarctus du myocarde. Les perturbations au niveau des coronaires sont engendrées par une dysfonction endothéliale résultant par exemple en un vasospasme ou à l'établissement d'une athérosclérose.

L'athérosclérose est la cause principale des maladies ischémiques coronariennes (Figure 7). Elle consiste en une infiltration de leucocytes et une différenciation des monocytes en macrophages (inflammation vasculaire), un dépôt des lipides, la formation d'une plaque ayant une couche fibreuse (athérome) et l'épaississement de la paroi vasculaire. Ainsi, la plaque athérosclérotique provoque soit un rétrécissement du vaisseau (réduction du débit sanguin) soit un thrombus (rupture de cette plaque et formation d'un caillot) amenant au blocage du vaisseau (Libby P, 2002).



**Figure 7. Schéma représentant le développement de la plaque athérosclérotique**

Au niveau de l'intima, il y a une infiltration de cellules inflammatoires et un dépôt de lipides résultant en un épaissement de la paroi vasculaire. La plaque athérosclérotique provoque soit un rétrécissement du vaisseau soit un thrombus amenant à un infarctus du myocarde (Tiré de Libby P, 2002).

L'arrêt de l'apport sanguin engendre une hypoxie menant à la mort des cardiomyocytes de la région desservie. Par conséquent, des processus essentiels et compensatoires tant au niveau cellulaire, structurel que fonctionnel sont déclenchés dans le myocarde ischémique et non ischémique. Cet ensemble de changements, connu sous le nom de remodelage cardiaque, permet la formation d'une cicatrice cardiaque et l'adaptation du myocarde non infarcté aux nouvelles conditions de travail afin de rétablir la fonction cardiaque. Le remodelage, constitué d'une phase aiguë et chronique, est très complexe et comporte plusieurs modifications au niveau de la morphologie du ventricule ainsi que de sa composition cellulaire. Une multitude de facteurs de croissance et de protéines participent activement à l'initiation et à l'établissement de ce remodelage (Sutton MG et Sharpe N, 2000; Xu YJ et al., 2004; Nian M et al., 2004).

Dans les sections suivantes, les changements hémodynamiques et moléculaires ainsi que les modifications au niveau de la région infarctée et non infarctée seront présentés.



## **2. Caractéristiques générales de l'infarctus du myocarde chez le rat**

Suite à un infarctus, la perte du tissu contractile amène à une dysfonction ventriculaire imposant une surcharge volumique chronique sur le myocarde. Il se produit des perturbations hémodynamiques au niveau du ventricule gauche marquées par une diminution de la fraction d'éjection et du volume éjecté ainsi qu'une augmentation de la pression en fin de diastole. De plus, une hypertrophie compensatoire et adaptative a lieu au niveau de la région non infarctée. Cette dernière est surtout enregistrée en laboratoire par l'augmentation du poids du ventricule gauche par rapport au poids total de l'animal. De plus, cette hypertrophie ventriculaire se traduit par la production du peptide natriurétique de l'oreillette, la diminution des niveaux de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de la pompe ATPase calcique du réticulum sarco-endoplasmic (*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA), la réexpression de l'actine squelettique ainsi que de la forme fœtale de la chaîne lourde de la myosine (*myosine heavy chain*, MHC) (transition de l'alpha-MHC à la beta-MHC). Au niveau du ventricule gauche non infarcté et de la cicatrice, les niveaux de collagène sont augmentés marquant respectivement la fibrose de réaction et de réparation (Meggs LG et al., 1990; Lorell BH et Carabello BA, 2000; Deten A et al., 2001; Xu YJ et al., 2004).

### **3. Région non ischémique**

Suite à l'infarctus du myocarde, la perte du tissu contractile au niveau de la région endommagée entraîne des altérations au niveau du myocarde non infarci. Bien qu'il soit adaptatif, le remodelage du myocarde non endommagé est un processus pathophysiologique caractérisé par des changements structurels et fonctionnels au niveau du tissu. Plusieurs facteurs participent à ce remodelage qui consiste en une fibrose de réaction interstitielle et en une hypertrophie cardiaque (Sutton MG et Sharpe N, 2000).

#### **3.1 Fibrose de réaction**

Dans la région non infarctée, une fibrose de réaction est déclenchée (Figure 8). Contrairement à la fibrose de réparation (voir section 4.3), cette fibrose est une réponse mal adaptative ayant lieu en absence de mort cellulaire. La présence de cytokines ainsi que de plusieurs facteurs de croissance comme le TGF-beta, l'angiotensine II, l'endothéline-1 et les catécholamines au niveau de la région non infarctée stimule la croissance des fibroblastes et augmente par conséquent la production ainsi que le dépôt du collagène de type I et III (Cleutjens JP et al., 1995; Manabe I et al., 2002). Ainsi, le dépôt de fibres de collagène entre les cellules aboutit à une augmentation de la rigidité du myocarde (perturbation de la contraction et de la relaxation cardiaque), à un défaut dans la conduction de l'influx électrique entre les cardiomyocytes (arythmies) et aussi, à une hypoxie au niveau de ces derniers

(Sabbah HN et al., 1995; Swynghedauw B, 1999; Manabe I et al., 2002). L'ensemble de ces processus contribue au développement d'une dysfonction ventriculaire menant à la défaillance cardiaque.

## 3.2 Hypertrophie cardiaque

Suite à un infarctus du myocarde, la surcharge volumique imposée sur la région non endommagée stimule le remodelage ventriculaire. Afin de maintenir le volume d'éjection, plusieurs mécanismes adaptatifs et compensatoires sont déclenchés comme l'activation du système sympathique et du système rénine-angiotensine-aldostérone qui sont à la base du processus de remodelage (Sutton MG et Sharpe N, 2000). En parallèle, plusieurs modifications au niveau du ventricule gauche sont aussi observées notamment une production du peptide natriurétique de l'oreillette ainsi qu'une réexpression chez le rat des isoformes fœtales de la MHC (transition de la forme alpha MHC à la forme beta MHC), de la chaîne légère de la myosine embryonnaire et de l'actine alpha du muscle squelettique (Swynghedauw B, 1999). De plus, afin de diminuer le stress sur la paroi ventriculaire, le myocarde non endommagé s'adapte à la surcharge volumique en augmentant sa masse musculaire, un processus connu sous le nom d'hypertrophie. Il existe deux sortes d'hypertrophie selon le type de surcharge imposée sur le cœur. Une surcharge de pression, retrouvée par exemple en condition de sténose aortique, engendre une hypertrophie concentrique caractérisée par une synthèse en parallèle des sarcomères menant à un épaissement de la paroi du myocarde. Une surcharge volumique, retrouvée par

exemple suite à un infarctus du myocarde, engendre une hypertrophie excentrique caractérisée par une synthèse en série des sarcomères menant à une dilatation de la cavité ventriculaire (Lorell BH et Carabello BA, 2000). L'hypertrophie a longtemps été considérée comme le seul mécanisme adopté par les cardiomyocytes face au stress hémodynamique. Par contre, des études récentes soutiennent un potentiel régénératif du tissu cardiaque suite à un dommage (voir section 2.1.1).

## **4. Région ischémique**

Le remodelage de la région infarctée comporte plusieurs événements. En premier lieu, une mort cellulaire est observée suivie d'une inflammation. Par la suite, les fibroblastes cardiaques se trans-différencient en myofibroblastes et une réponse angiogénique a lieu. Récemment, deux composantes cellulaires ont été identifiées faisant partie intégrante de la cicatrice cardiaque soient l'innervation sympathique et une population cellulaire ayant un phénotype ressemblant aux cellules souches neuronales. Dans les sections suivantes, les différentes composantes cellulaires de la cicatrice cardiaque seront élaborées.

### **4.1 Mort cellulaire**

L'interruption de l'apport en oxygène provoque la mort des cardiomyocytes de la région ischémique par apoptose ainsi que par nécrose chez les animaux et les humains (Tanaka M et al., 1994; Itoh G et al., 1995; Kajstura J et al., 1996; Bialik S et al., 1997; Saraste A et al., 1997). Le groupe de Kajstura a démontré que durant les premières heures suite à un infarctus du myocarde, l'apoptose cause la perte de 90% des cellules. En parallèle, la nécrose est hautement présente le premier jour suite à l'infarctus du myocarde et persiste durant des jours. Cette nécrose contribue ainsi à la perte progressive des cardiomyocytes (Kajstura J et al., 1996). De plus, il a été montré que le stress oxydatif ainsi que les facteurs libérés par les cellules nécrotiques initient d'une part le processus d'inflammation et d'autre part, provoquent la mort

cellulaire par apoptose (Krown KA et al., 1996; Meldrum DR et al., 1998; Von Harsdorf R et al., 1999). L'apoptose est une mort cellulaire programmée où une réduction de la taille de la cellule est observée ainsi qu'une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'intégrité membranaire est conservée tout au long du processus et la cellule est éliminée subséquemment par phagocytose (Kerr JF et al., 1972; Majno G et Joris I, 1995). Par contre, la nécrose se caractérise par une perte de l'intégrité membranaire et la libération du contenu cellulaire induisant une réponse inflammatoire (Itoh G et al., 1995; Li M et al., 2001). Cette inflammation joue un rôle crucial dans le processus de cicatrisation.

## 4.2 Inflammation

Suite à la mort des cardiomyocytes de la région infarctée, une réaction inflammatoire essentielle à la réparation tissulaire est déclenchée (Frangogiannis NG et al., 2002; Ertl G et Frantz S, 2005). L'inflammation est un phénomène complexe nécessitant la participation de plusieurs composantes. Suite à la mort cellulaire, plusieurs cytokines pro-inflammatoires et facteurs libérés comme le TNF-alpha, l'interleukine (IL)-1, IL-6, le TGF-beta, les compléments et les radicaux libres déclenchent un processus inflammatoire (Hill JH et Ward PA, 1971; Pinckard RN et al., 1975; Rossen RD et al., 1985; Herskowitz A et al., 1995; Meldrum DR, 1998; Deten A et al., 2001; Deten A et al., 2002; Lu L et al., 2004). Ces facteurs sont responsables de la synthèse de chimiokines comme la protéine chimioattractante des

monocytes (*monocyte chemoattractant protein*) et le facteur stromal cellulaire (*stromal cell factor*) attirant les leucocytes au site endommagé comme les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes (Birdsall HH et al., 1997; Frangogiannis NG et al., 1998b; Frangogiannis NG et al., 2002). L'accumulation des cellules immunitaires entraîne une synthèse accrue des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques ainsi que des facteurs chimioattractants. Par conséquent, la réponse inflammatoire est amplifiée menant à la libération de facteurs additionnels qui contribuent significativement aux processus de l'angiogenèse et de la fibrose (Wahl SM et al., 1987; Gordon JR et Galli SJ, 1990; Yue P et al., 1998; Frangogiannis NG et al., 1998a; Heba G et al., 2001).

La réponse inflammatoire est un événement indispensable pour une réparation tissulaire adéquate. Plusieurs études ont démontré l'effet délétère de la thérapie anti-inflammatoire avec les corticostéroïdes synthétiques dans la phase aiguë suite à un infarctus du myocarde (Bulkley BH et Roberts WC, 1974; Roberts R et al., 1976; Sholter DE et Armstrong PW, 2000). Ces substances retardent le processus de cicatrisation, provoquent une augmentation de la taille de la cicatrice (expansion et amincissement) et engendrent même la rupture de la paroi ventriculaire menant ainsi à la mort.

## 4.3 Fibrose de réparation

La formation d'une cicatrice cardiaque permanente est une réponse physiologique essentielle et adaptative ayant lieu suite à la mort cellulaire (Sun Y et Weber KT, 2000; Manabe I et al., 2002). Elle est connue sous le nom de fibrose de réparation et plusieurs événements cellulaires y sont associés. Le but ultime de cette fibrose est le remplacement des cardiomyocytes morts afin d'assurer l'intégrité du tissu cardiaque et d'empêcher la rupture du myocarde. En effet, une perturbation du processus de la fibrose de réparation engendre un amincissement de la cicatrice menant à une dilatation ventriculaire et à un remodelage cardiaque inadéquat (Sholter DE et Armstrong PW, 2000; Fazel S et al., 2006; Cimini M et al., 2007; Barandon L al., 2003; Wang Y et al., 2004; Lindsey ML et al., 2002). Contrairement aux anciennes croyances, la cicatrice n'est plus considérée comme un milieu passif rempli de collagène mais plutôt comme un tissu dynamique. La cicatrice est vascularisée, innervée par le système sympathique et composée de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes ainsi que de cellules immunopositives pour le filament intermédiaire nestine (*neuroepithelial stem cell protein*) (Sun Y et Weber KT, 2000; Drapeau J et al., 2005; Vracko R et al., 1990; Zhou S et al., 2004). Ces différentes composantes de la cicatrice cardiaque sont présentées dans les sections suivantes et leur importance dans le processus de cicatrisation est soulignée.



### 4.3.1 Composition cellulaire de la cicatrice cardiaque

La région infarctée représente un milieu de cicatrisation unique où les cellules composant le tissu sont sujettes à des forces physiques (battement cardiaque; contraction et étirement continus) ainsi qu'à un milieu hypoxique contenant des facteurs de croissance et des cytokines. Dans les sections suivantes, les myofibroblastes, l'angiogenèse, les cellules souches neuronales nestine positives ainsi que l'innervation sympathique seront discutés.

#### 4.3.1.1 Les myofibroblastes

Lors de la réparation tissulaire, les fibroblastes se trans-différencient en cellules possédant des caractéristiques de cellules musculaires lisses nommées myofibroblastes (Gabbiani G et al., 1971; Majno G et al., 1971; Sun Y et Weber KT, 1996a). Les myofibroblastes proviennent principalement de la population résidente de fibroblastes cardiaques (Darby I et al., 1990; Yano T et al., 2005). Des études démontrent aussi que certains myofibroblastes sont dérivés de cellules circulantes appelées fibrocytes provenant de la moelle osseuse (Bucala R et al., 1994; Abe R et al., 2001; Möllmann H et al., 2006). Les myofibroblastes représentent le type cellulaire principal de la région infarctée menant à la restauration de l'intégrité tissulaire suite au dommage. Ils sont présents dès trois jours, persistent dans la cicatrice et jouent un rôle fondamental dans le remodelage et la réparation tissulaire (Willems IE et al., 1994; Sun Y et Weber KT, 1996b).

#### 4.3.1.1.A Caractéristiques des myofibroblastes

Les myofibroblastes possèdent à la fois des caractéristiques de fibroblastes ainsi que de cellules musculaires lisses (Eddy RJ et al., 1988). Ils sont entourés d'une matrice extracellulaire riche en fibronectine et ils possèdent un réticulum endoplasmique rugueux ainsi qu'un appareil de Golgi ressemblant à celui des fibroblastes. Ils contiennent la chaîne lourde de la myosine non musculaire contrairement aux cellules musculaires lisses qui sont composées de la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse. Par contre, les myofibroblastes possèdent un réseau fibrillaire complexe ressemblant à celui des cellules musculaires lisses et ils expriment l'actine alpha du muscle lisse (alpha-SMA) (Figure 9). Les marqueurs les plus utilisés afin d'identifier les myofibroblastes sont la alpha-SMA ainsi que la vimentine (Frangogiannis NG et al., 2000; Drapeau J et al., 2005).

#### 4.3.1.1.B Facteurs contrôlant la croissance et la fonction des myofibroblastes

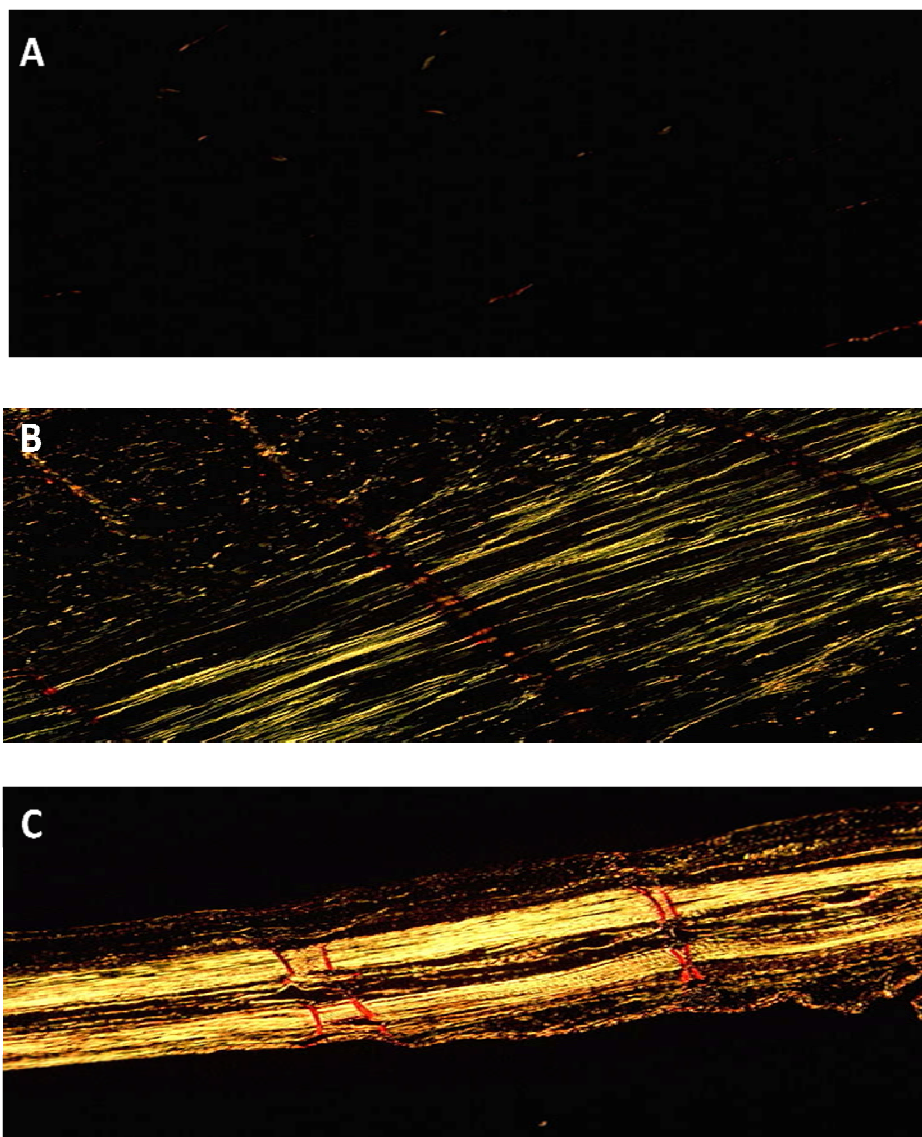
Différents facteurs pro-fibrotiques tels que les cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance notamment le TGF-beta, l'angiotensine II, l'endothéline-1 et les catécholamines sont présents dans la région infarctée. Ces facteurs stimulent la trans-différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, leur prolifération ainsi que la synthèse de collagène par ces derniers. Les myofibroblastes sont aussi des producteurs importants de ces facteurs (production autocrine et paracrine) (Sun Y et

Weber KT, 1996a; Sun Y et Weber KT, 1996b; Campbell SE et Katwa LC, 1997; Manabe I et al., 2002). En effet, les myofibroblastes expriment l'enzyme de conversion de l'angiotensine responsable de la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine II. De plus, les myofibroblastes expriment les récepteurs de l'angiotensine II, l'AT1 et l'AT2 qui font parties des récepteurs couplés aux protéines G. La stimulation du récepteur AT1 active plusieurs voies de signalisation telles que la protéine kinase C, la phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase ainsi que les mitogen-activated protein kinases. En général, ces voies de signalisation stimulent la prolifération des myofibroblastes et mènent à l'activation de gènes cibles profibrotiques tel que l'endothéline-1 et le TGF-beta (Sutton MG et Sharpe N, 2000; Manabe I et al., 2002). L'endothéline-1 stimule l'accumulation du collagène en augmentant sa synthèse et en réduisant l'activité des métalloprotéinases matricielles qui sont responsables de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. L'action de l'endothéline-1 a lieu aussi par l'augmentation de l'expression du TGF-beta (Fraccarollo D et al., 2002). Ainsi, le TGF-beta joue un rôle central dans la fibrose. Il se lie sur le récepteur sérine/thréonine T $\beta$ RII. Ce récepteur s'hétérodimérise avec le récepteur sérine/thréonine type I (T $\beta$ RI) et une transphosphorylation entre ces récepteurs a lieu. Ceci déclenche l'activation de la cascade des protéines Smad qui, une fois transloquées au noyau, activent des gènes cibles impliqués dans la fibrose. Le TGF-beta active aussi d'autres voies de signalisation comme la c-Jun-N-terminal kinase, l'extracellular signal regulated kinase et la p38 (Tomasek JJ et al., 2002; Bujak M et Frangogiannis NG, 2007; Wynn TA, 2008). En général, le TGF-beta induit la fibrose en stimulant l'expression de l'alpha-SMA au

niveau des myofibroblastes, ce qui confère la propriété contractile de ces cellules (Hirschel BJ et al., 1971; Gabbiani G et al., 1972; Desmoulière A et al., 1993; Gabbiani G. 1998). Le TGF-beta provoque aussi la synthèse et le dépôt accru du collagène de type I et III par les myofibroblastes, diminue l'expression des métalloprotéinases matricielles et augmente la synthèse des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases qui inhibent les métalloprotéinases matricielles (Figure 8) (Cleutjens JP et al., 1995; Petrov VV et al., 2002; Bujak M et Frangogiannis NG, 2007). Finalement, il faut noter que les myofibroblastes sécrètent aussi le facteur de croissance des nerfs (*nerve growth factor*, NGF) et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) qui sont des facteurs neurotrophiques et angiogéniques (Donovan MJ et al., 2000; Emanuelli C et al., 2002; Drapeau J et al., 2005). De plus, le NGF est fibrogénique puisqu'il stimule la trans-différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Micera A et al., 2001).

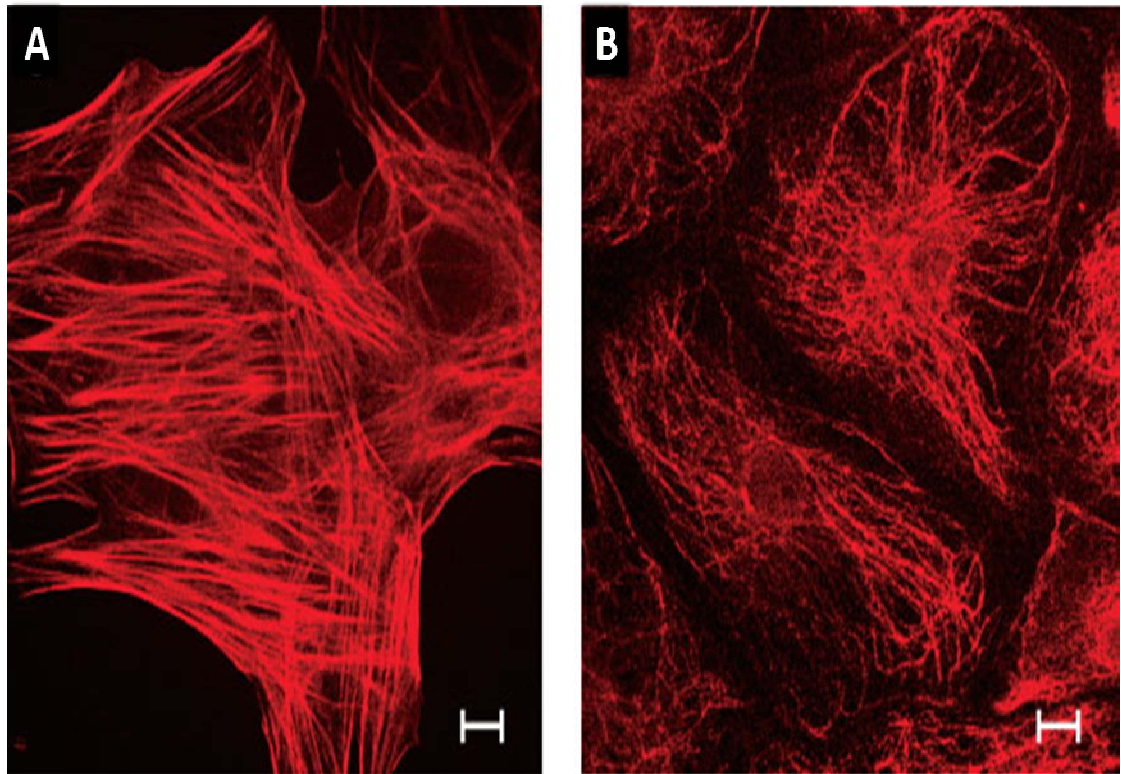
Au cours de la réparation tissulaire, les myofibroblastes sécrètent des niveaux élevés de protéines extracellulaires assurant le développement d'une cicatrice rigide et empêchant son expansion. Ainsi, une augmentation de la présence de ces cellules dans la région infarctée est un événement fondamental menant à un remodelage cicatriciel adéquat et à une amélioration de la fonction ventriculaire. En effet, une diminution de la prolifération des myofibroblastes et de la synthèse de collagène est associée à une perturbation de la réparation tissulaire menant à un amincissement de la cicatrice et à une dilatation ventriculaire (Sholter DE et Armstrong PW, 2000; Fazel S et al., 2006; Cimini M et al., 2007). L'importance des myofibroblastes dans la fibrose de réparation a aussi été soulignée par l'injection de collagène au niveau de

la région infarctée qui résulte en une augmentation de l'épaisseur de la cicatrice et en une amélioration de la fonction ventriculaire (Dai W et al., 2005).



**Figure 8. Marquage au rouge sirius du collagène type I**

Coupe histologique de cœurs de rats. (A) Au niveau du ventricule gauche normal, une très faible expression du collagène (jaune) est observée reflétant les niveaux de base présents dans la matrice extracellulaire. Suite à un infarctus du myocarde, les niveaux de collagène augmentent et un dépôt accru est observé au niveau (B) du myocarde non infarcté (fibrose de réaction) et (C) infarcté (fibrose de réparation) (*résultats non publiés du laboratoire, grossissement 20X*).



**Figure 9. Marquage des myofibroblastes dérivés de cicatrices cardiaques de rats**

(A) Les myofibroblastes en culture primaire expriment l'actine alpha du muscle lisse et (B) la vimentine. L'échelle représente 10  $\mu\text{m}$  (Tiré et adapté de Drapeau J et al., 2005).

**4.3.1.2 L'innervation sympathique de la cicatrice cardiaque**

Suite à un infarctus du myocarde, la région non infarctée devient hyperinnervée par des fibres sympathiques (Vracko R et al., 1990; Zhou S et al., 2004). Ce phénomène est attribué à l'augmentation des niveaux du facteur neurotrophique NGF dans le cœur infarcté. Le NGF est capturé par les fibres sympathiques et acheminé par

transport rétrograde vers le ganglion stellaire gauche. Ceci déclenche la croissance des fibres sympathiques à partir du ganglion menant ainsi à l'hyperinnervation du cœur (Cao JM et al., 2000a; Cao JM et al., 2000b; Hassankhani A et al., 1995; Fitzsimonds RM et Poo MM, 1998). D'ailleurs, l'hyperinnervation est observée suite à l'injection du NGF au niveau du ganglion ainsi que chez des souris transgéniques surexprimant le NGF. Le rôle principal du système sympathique dans le cœur endommagé est le support inotropique. L'hyperinnervation est par contre responsable de l'arythmie et de la mort subite suite à un infarctus du myocarde.

La réinnervation de la région infarctée et péri-infarctée par des fibres sympathiques (cellules de Schwann et des axones) a aussi été démontrée (Vracko R et al., 1990; Zhou S et al., 2004). Ces études suggèrent une régénération de ces fibres à partir de fibres préexistantes situées dans la région non endommagée. De plus, cette régénération a été associée à la présence de facteurs neurogéniques et neurotrophiques comme le NGF et le BDNF. Ces facteurs sont impliqués dans plusieurs événements notamment la survie et la différenciation des cellules souches neuronales, la croissance axonale et l'angiogenèse (Han BH et Holtzman DM, 2000; Donovan MJ et al., 2000; Zhou S et al., 2004). Notre laboratoire a aussi démontré l'innervation cicatricielle par des fibres sympathiques neurofilament (NF)-M positives (Drapeau et al., 2005) (Figure 10). Nous avons détecté aussi le NGF dans les myofibroblastes cicatriciels et les cellules nestine positives. Une expression du BDNF a été aussi observée au niveau des cellules nestine positives (Drapeau J et al., 2005). Ces résultats suggèrent qu'en plus de contenir des éléments favorisant la fibrose et l'angiogenèse, le milieu cicatriciel comporte aussi des facteurs

neurogéniques (Sun Y et Weber KT, 1996a; Sun Y et Weber KT, 1996b; Campbell SE et Katwa LC, 1997; Donovan MJ et al., 2000; Manabe I et al., 2002; Emanuelli C et al., 2002; Drapeau J et al., 2005). Le rôle de la réinnervation de la cicatrice cardiaque par les fibres sympathiques est actuellement indéfini. Il est bien établi par contre que l'hyperinnervation de la région non infarctée provoque l'expansion de l'infarctus ainsi que l'arythmie (Cao JM et al., 2000a; Cao JM et al., 2000b; Communal C et Colucci WS, 2005). Jusqu'à présent, les données recueillies sur l'innervation sympathique de la cicatrice cardiaque ressemblent à celles retrouvées au niveau de la peau et du muscle squelettique. Ces données permettent de spéculer sur la contribution de l'innervation sympathique dans la fibrose de réparation. En effet, la réinnervation par les fibres sympathiques de la cicatrice cardiaque pourrait, semblablement à d'autres organes, jouer un rôle modulateur sur les myofibroblastes et la réponse angiogénique favorisant un remodelage cicatriciel adéquat. La section suivante aborde l'importance de l'innervation sympathique dans la réparation tissulaire au niveau de différents organes.

#### *4.3.1.2.A Le rôle de l'innervation sympathique dans le remodelage cicatriciel suite à un dommage*

Lors de la réparation tissulaire, l'innervation de la région endommagée par des fibres sympathiques a été observée. La contribution de cet événement dans le processus de cicatrisation a été soulignée par plusieurs groupes et ce, au niveau de différents organes. Ce processus représente un événement important requis pour une

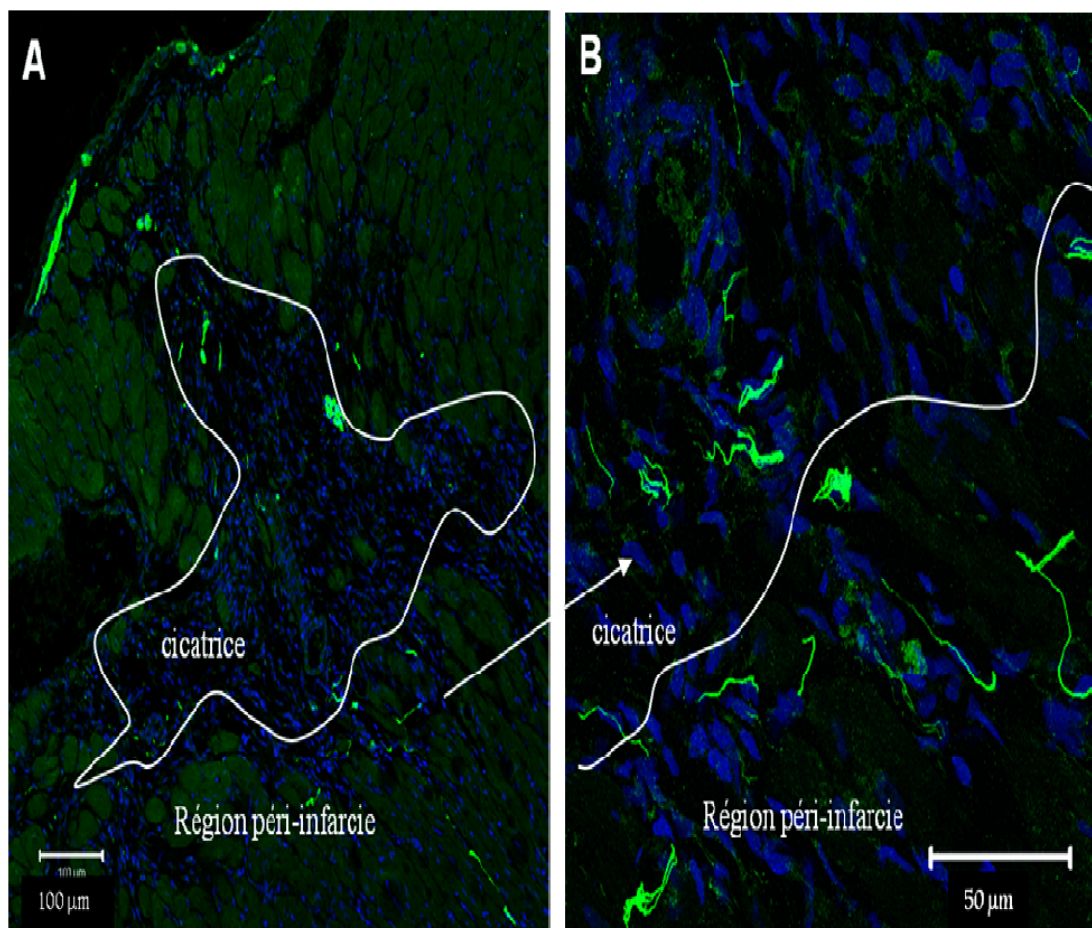


cicatrisation adéquate puisqu'il régule la prolifération des myofibroblastes, l'angiogenèse ainsi que l'inflammation (Kim LR et al., 1998; Altun V et al., 2001; Kishimoto S et al., 1982). D'ailleurs, la perturbation de la régénération de ces fibres a des effets délétères sur les myofibroblastes ainsi que sur la réponse angiogénique menant par conséquent à une cicatrisation mal adaptative.

Les études au niveau de la peau démontrent que les fibres sympathiques innervent les myofibroblastes et stimulent leur prolifération par la sécrétion du NGF. Comme déjà mentionné, les myofibroblastes sont aussi une source de NGF et facilitent la réinnervation tissulaire (Matsuda H et al., 1998; Hasan W et al., 2000; Zhou S et al., 2004; Drapeau J et al., 2005). En plus de son rôle dans la fibrose (voir section 4.3.1.1.B), le NGF est aussi impliqué dans la survie et la différenciation des neurones sympathiques. Il participe à la réinnervation (croissance axonale), régule la synthèse des neurofilaments et promouvoit la migration des cellules de Schwann. Au niveau périphérique, les cellules de Schwann jouent un rôle dans la croissance axonale des fibres sympathiques (Anton ES et al., 1994; Hayworth CR et al., 2006; Kang H et al., 2007).

Au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux, une dénervation sympathique engendre une diminution de la densité des capillaires, un phénomène attribué à la diminution du NGF (Liu M et al., 1999; Asano A et al., 1997; Donovan MJ et al., 2000; Emanuelli C et al., 2002). Le NGF joue un rôle dans l'angiogenèse notamment en stimulant la prolifération des cellules endothéliales et en diminuant leur apoptose. Il stimule aussi la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) qui est un puissant facteur

angiogénique. Suite à un dommage ischémique au niveau du muscle squelettique, l'injection du NGF provoque une augmentation de la densité des capillaires et des artérioles (Emanueli C et al., 2002; Nico B et al., 2008).



**Figure 10. Visualisation en microscopie confocale des fibres sympathiques au niveau de la cicatrice cardiaque et de la région péri-infarctie**

A) Les fibres sympathiques immunopositives pour le filament intermédiaire NF-M (vert) sont détectées dans la cicatrice et dans la région péri-infarctie. Les noyaux sont marqués avec le to-pro<sup>3</sup> (bleu). La cicatrice cardiaque est délimitée avec un contour blanc. B) Agrandissement d'une zone de la photo A (*résultats non publiés du laboratoire*).

### 4.3.1.3 L'angiogenèse

Suite à un infarctus du myocarde, de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés au niveau de la région endommagée (angiogenèse *de novo*). Ce processus est stimulé par la présence de plusieurs facteurs angiogéniques (VEGF, TGF-beta, NGF) (Frangogiannis NG et al., 2002). Lors de la régénération tissulaire, l'angiogenèse est nécessaire afin d'alimenter et d'oxygéner les différentes populations cellulaires de la région infarctée. Elle contribue à l'épaississement de la cicatrice limitant ainsi l'expansion de cette dernière et la dilatation ventriculaire (Barandon L al., 2003; Wang Y et al., 2004; Lindsey ML et al., 2002). Par contre, la réponse angiogénique endogène est limitée faisant en sorte que les niveaux d'oxygène au niveau de la région infarctée demeurent réduits. Ceci est attribué au faible taux prolifératif des cellules endothéliales matures qui est défavorable pour le processus angiogénique (Hristov M et al., 2003). Ainsi, la mobilisation de cellules possédant un potentiel angiogénique comme les cellules c-kit positives et les cellules endothéliales progénitrices est nécessaire afin d'augmenter l'angiogenèse (Beltrami AP et al., 2003; Hristov M et al., 2003; Anversa P et al., 2006). Ces cellules sont recrutées vers la région infarctée et, suite à leur différenciation en cellules endothéliales, participent à la formation de nouveaux vaisseaux.

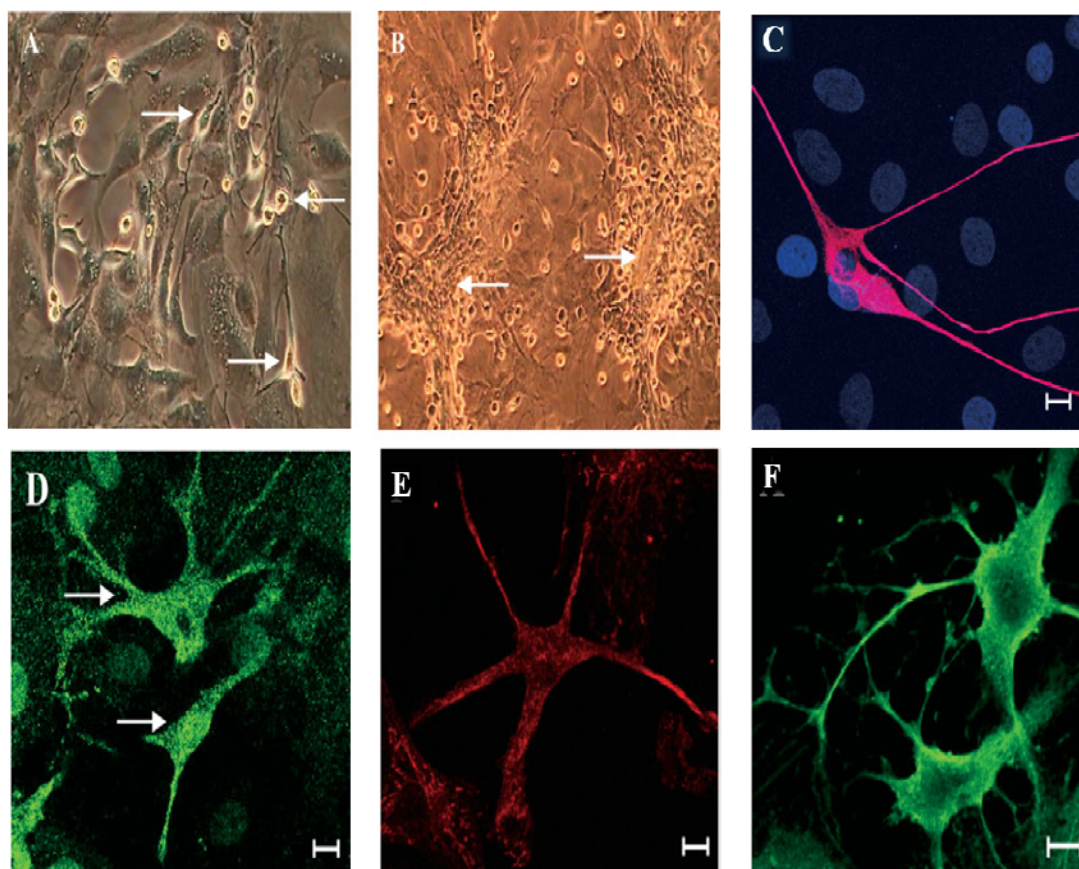
#### 4.3.1.4 Les cellules nestine positives de la cicatrice cardiaque (Neural-like stem cells)

Récemment, notre équipe a identifié une nouvelle composante cellulaire de la région infarctée (Drapeau J et al., 2005). Il s'agit d'une population de cellules morphologiquement distincte des myofibroblastes cicatriciels détectées dans les cultures cellulaires provenant de cicatrices cardiaques de rats. La morphologie ainsi que l'expression de certains marqueurs ont permis de caractériser ces cellules comme étant des cellules ressemblant aux cellules souches neuronales nestine positives retrouvées au niveau du système nerveux central et périphérique (*neural-like stem cell*). Ces cellules possèdent des caractéristiques propres aux cellules souches neuronales du cerveau notamment une morphologie neuronale dotée de plusieurs processus/extensions ainsi que l'expression du filament intermédiaire nestine (Lendahl U et al., 1990; Drapeau J et al., 2005). Le nombre de ces cellules augmente en culture et des agrégats cellulaires sont observés. Nous détectons aussi la présence en culture d'astrocytes réactifs, d'oligodendrocytes et de neurones immunopositifs à la protéine glio-fibrillaire acide (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP), à la protéine myelin oligodendrocyte specific protein (MOSP) et au NF-M respectivement (Figure 11). *In vivo*, nestine est détectée dans la région péri-infarctée et infarctée (Figure 12). De plus, nos données montrent que le milieu cicatriciel représente un milieu propice pour la différenciation de ces cellules souches en cellules neuronales et gliales notamment par la présence des facteurs neurotrophiques et neurogéniques tels que le NGF et le BDNF.

Notre équipe a été la première en 2005 à identifier la présence de cellules nestines positives au niveau du cœur. Depuis, l'expression de nestine a été examinée par d'autres groupes de recherche appuyant ainsi nos recherches sur ce type cellulaire. Récemment, à l'aide des techniques d'analyse protéomique, d'immunofluorescence et de RT-PCR, le groupe de Scobioala a confirmé la présence de la protéine et de l'ARNm de nestine dans le cœur infarci de souris et d'humains (Scobioala S et al., 2008). Cette étude est en accord avec les publications qui composent cette thèse. De plus, ils confirment les résultats d'une publication récente de notre laboratoire traitant du potentiel régénératif des cellules souches cardiaques nestine positives (Beguin PC et al., 2009). Dans cet article, nous montrons qu'une sous population de cellules souches neuronales nestine positives exprime des marqueurs de cellules cardiaques progénitrices notamment le Nkx2.5 et la protéine de liaison GATA-4 (*GATA binding protein 4*, GATA4). Ces cellules peuvent générer des cardiomyocytes nestine positifs retrouvés dans la région péri-infarciée et infarciée. En parallèle, Mokry et al. démontrent la présence de cardiomyocytes adultes nestine positifs dans le cœur endommagé. Ils associent l'expression de nestine au niveau de ces cellules à une réorganisation des filaments cytosquelettiques (Mokry J et al., 2008a). Ces chercheurs avancent l'hypothèse que, suite à un dommage ischémique, la surcharge hémodynamique induit des modifications structurales au niveau du cardiomyocyte amenant à une augmentation du contenu, de la densité ainsi que de la distribution des filaments cytosquelettiques tel que desmine. Cette restructuration du cytosquelette sollicite ainsi la présence de nestine qui est connue pour sa capacité à se dimériser avec les autres filaments intermédiaires (voir section 4.3.1.5.1).

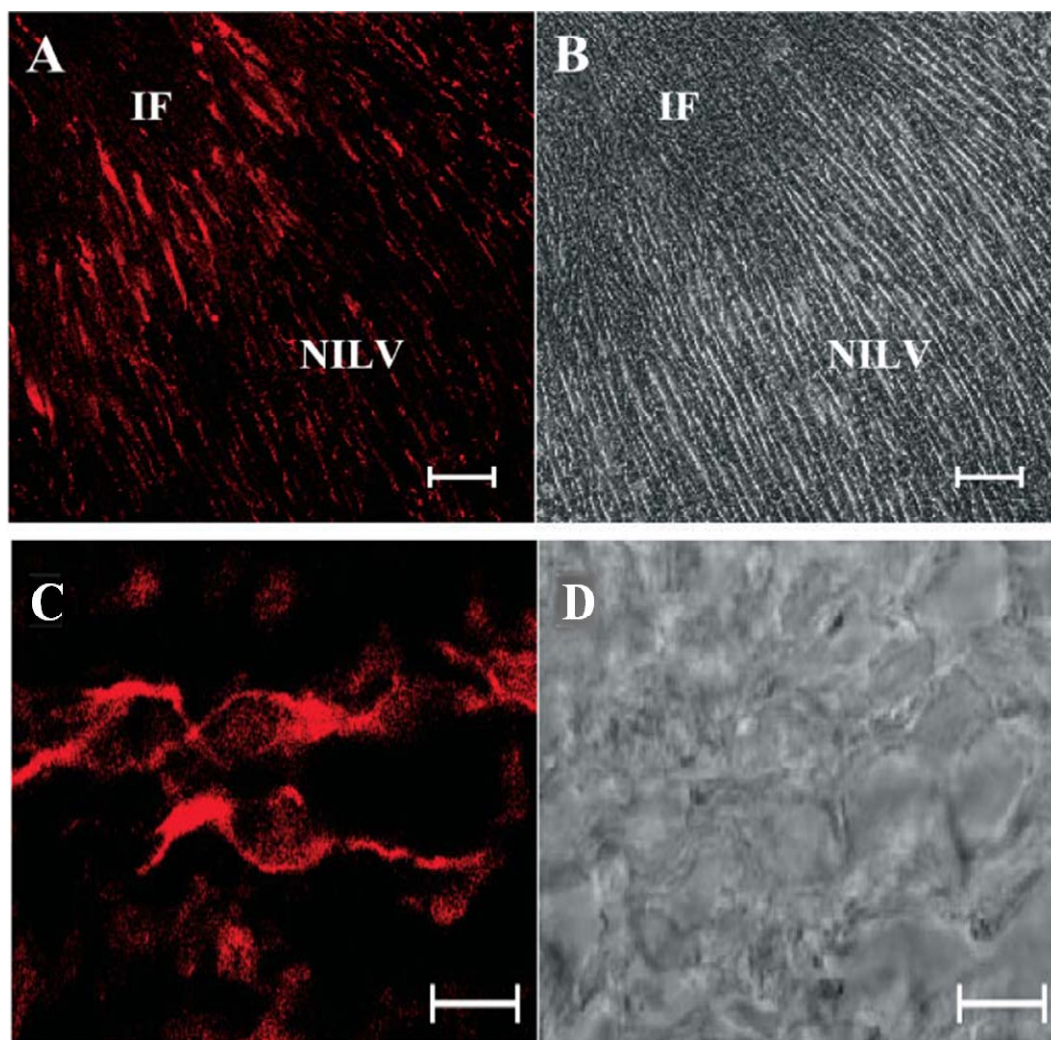
Le groupe de Tomita a aussi démontré la présence dans le cœur d'une population dormante dérivée de la crête neurale nommée "*side population, SP*" (Tomita Y et al., 2005). Ces cellules migrent au cours du développement embryonnaire vers le cœur où elles restent dormantes sous forme non différenciée. En culture, ces cellules prolifèrent sous forme de cardiosphères et expriment les marqueurs des cellules souches neuronales nestine et musashi-1. Musashi 1 est un facteur transcriptionnel impliqué dans la division asymétrique des cellules souches (Sakakibara S et al., 1996). Une portion de ces cellules exprime aussi GATA4 qui est un marqueur des cellules progénitrices cardiaques. Les cellules "*side population*" sont multipotentes car elles se différencient *in vitro* en cardiomyocytes, en neurones, en cellules gliales et en cellules musculaires lisses. De plus, leur injection *in vivo* résulte en une différenciation en cardiomyocytes et en cellules musculaires lisses.

Étant donné que la nouvelle population cellulaire identifiée par notre laboratoire possède un phénotype analogue aux cellules souches neuronales du système nerveux central et périphérique, la section suivante traite tout d'abord des critères permettant le classement d'une cellule comme étant une cellule souche. Par la suite, les cellules souches neuronales nestine positives du système nerveux central et périphérique ainsi que leur rôle physiologique dans la réparation tissulaire seront abordés.



### **Figure 11. Culture cellulaire de cicatrices cardiaques de rats**

A) Parmi les myofibroblastes cicatriciels, des cellules ayant des processus/extensions rappelant le phénotype neuronal sont montrées par les flèches (agrandissement 20X). B) Après 10-14 jours en culture, ces cellules forment des agrégats (indiqués par les flèches) (agrandissement 10X). C) Ces cellules sont immunopositives au marqueur de cellules souches neuronales nestine (rouge) tandis que les myofibroblastes sont immunonégatifs pour nestine. Les noyaux sont marqués avec le propidium iodide. D)E)F) Présence de cellules immunopositives à GFAP, MOSP et NFM représentant respectivement des astrocytes réactifs, des oligodendrocytes et des neurones. L'échelle représente 10  $\mu\text{m}$  (Tiré et adapté de Drapeau J et al., 2005).



**Figure 12. Présence de nestine au niveau du cœur de rats suite à un infarctus du myocarde**

(A) Nestine est détectée dans la région infarctée (IF) et non infarctée du myocarde (NILV). (B) Contraste de phase de la photo A. (C) Cellules nestine positives localisées dans la région infarctée. (D) Contraste de phase de la photo C. (A-B l'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ ) (C-D l'échelle représente 10  $\mu\text{m}$ ) (*Tiré et adapté de Drapeau J et al., 2005*).



#### 4.3.1.4.A Définition et caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées possédant deux caractéristiques principales. Premièrement, elles ont la capacité de s'auto-renouveler de façon illimitée créant ainsi un réservoir de cellules filles identiques indifférenciées. Deuxièmement, elles génèrent des cellules progénitrices de transition possédant une capacité limitée de prolifération. Ces cellules se répliquent pour un temps limité et fournissent des sous populations de cellules différenciées ayant des fonctions spécialisées comme des cellules nerveuses et des cellules musculaires. Les cellules souches sont classées selon le nombre de lignées cellulaires générées. Les cellules souches totipotentes ont la capacité de former l'organisme en entier. Les cellules souches pluripotentes produisent toutes les cellules de l'organisme sauf les cellules trophoblastes du placenta. Les cellules souches multipotentes forment toutes les lignées cellulaires constituant un tissu, tandis que les cellules souches unipotentes et oligopotentes forment une seule lignée cellulaire ou deux lignées cellulaires respectivement (Stemple DL et Anderson DJ, 1992; Gage FH, 2000; Merkle FT et Alvarez-Buylla A, 2006; Delfino-Machín M et al., 2007).

Récemment, la propriété multipotente des cellules souches a tourné l'attention de la communauté scientifique vers la médecine régénératrice et la thérapie cellulaire. Ainsi chez l'adulte, plusieurs types de cellules souches ont été identifiés comme les cellules souches de la moelle osseuse ainsi que les cellules souches neuronales du système nerveux central et périphérique (Gage FH, 2000; Toma JG et

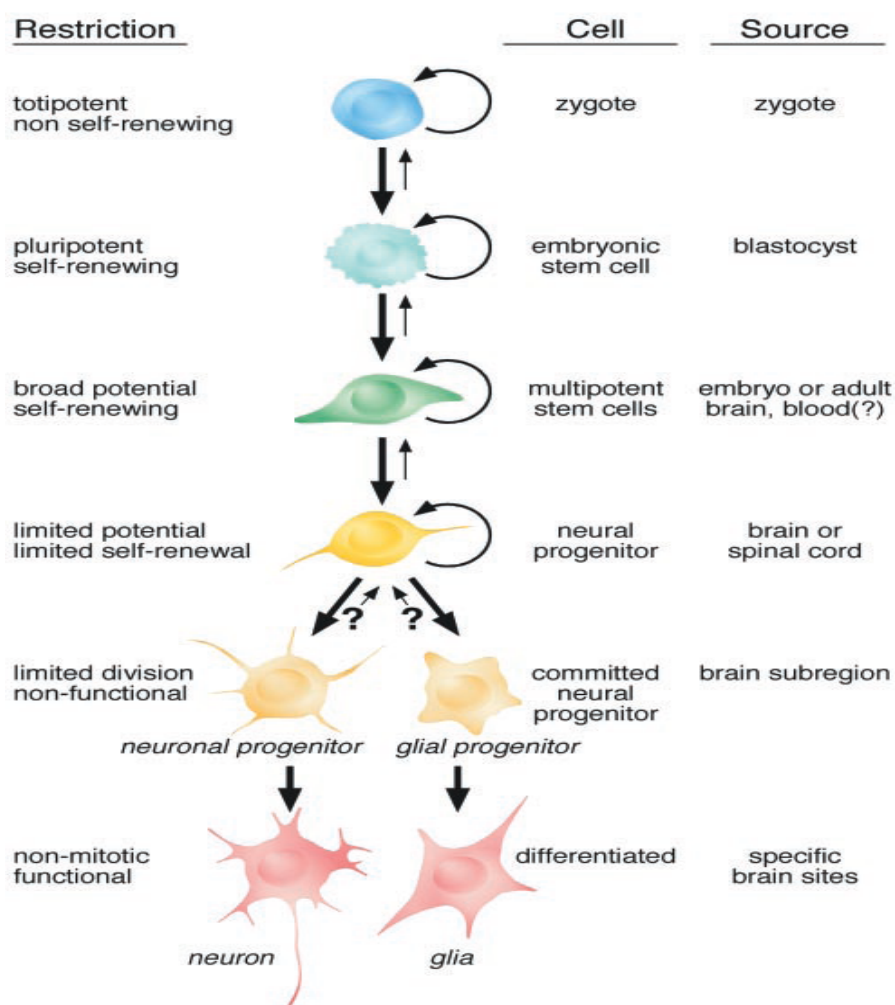
al., 2001; Amoh Y et al., 2004; Beltrami AP et al., 2003; Oh H et al., 2003; Yoon YS et al., 2005).

#### 4.3.1.5 Les cellules souches neuronales nestine positives du système nerveux central

Au cours du développement du système nerveux central, les cellules souches neuronales nestine positives du neuroépithélium se différencient en neurones (neurogenèse) et en cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes; gliogenèse) (Figure 13) (Gage FH, 2000). Cette différenciation implique un changement de la morphologie de la cellule ainsi que de sa composition en filaments cytosquelettiques (Hockfield S et McKay RD, 1985; Frederiksen K et McKay RD, 1988; Lendahl U et al., 1990). Chez l'adulte, ce phénomène est observé dans certaines régions du système nerveux central notamment les bulbes olfactifs, les zones sous-ventriculaires et le gyrus denté hippocampique (Gage FH et al., 1995). Suite à un dommage au niveau du système nerveux central, les cellules souches neuronales nestine positives prolifèrent et sont recrutées vers la région endommagée où elles jouent un rôle dans la neurogenèse et la gliogenèse (Lin RC et al., 1995; Johansson CB et al., 1999; Rice AC et al., 2003; Kronenberg G et al., 2005). De plus, il a été démontré que les cellules souches neuronales se différencient en cellules endothéliales et contribuent *in vivo* à la formation de vaisseaux positifs au marqueur endothéliale VE cadhérine, soulignant ainsi la plasticité de ces cellules (Wurmser AE et al., 2004; Oishi K et al., 2004).

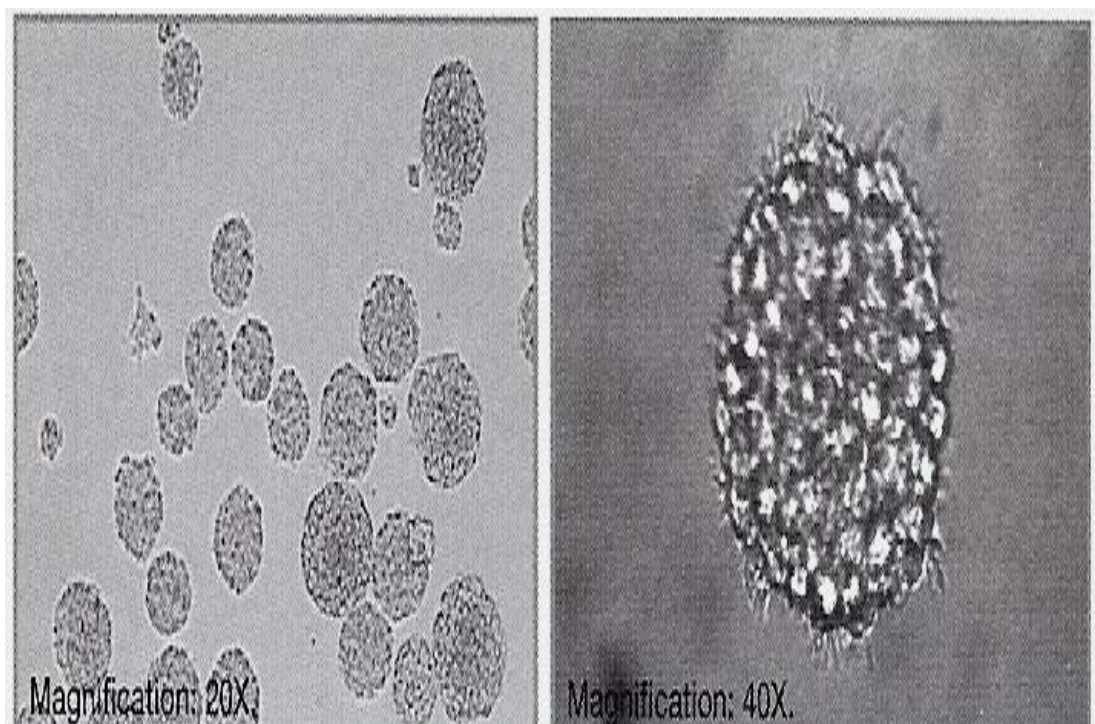
Les cellules souches neuronales nestine positives ont été isolées et mises en culture *in vitro* où elles prolifèrent sous forme d'une structure sphérique (neurosphère) (Figure 14) en présence des facteurs de croissance de l'épiderme (EGF) et des fibroblastes (FGF) (Reynolds BA et Weiss S, 1992; Gage FH, 2000). Cette capacité de proliférer sous forme d'une structure sphérique flottante représente en effet une caractéristique propre aux cellules souches neuronales.

### Potential Stem Cells with Neural Capability



**Figure 13. Représentation schématique des différentes classes de cellules souches possédant un potentiel de différenciation neuronale**

Les classes de cellules souches de mammifères formant des cellules neuronales et gliales sont représentées sous forme hiérarchique du stade primitif (cellules souches primitives, en haut) au stade différencié (cellules matures, en bas). Les cellules souches totipotentes sont les plus primitives et elles peuvent recréer un organisme complet. Les cellules souches pluripotentes forment tous les types de cellules retrouvés dans l'organisme. Les cellules souches multipotentes donnent toutes les cellules constituant le tissu nerveux en générant des cellules progénitrices neuronales et gliales responsables de la production de neurones et de cellules gliales (*Tiré de Gage FH, 2000*).



**Figure 14. Formation de neurosphères par des cellules souches neuronales**

Les cellules souches neuronales du système nerveux central, isolées à partir d'un embryon de souris E14, poussent en culture sous forme de structures flottantes nommées neurosphères. Les cellules souches neuronales sont maintenues ainsi dans un état prolifératif non différencié (*Tiré du catalogue Products for Neural Stem Cell Research, StemCell Technologies Inc*).

L'isolation des cellules souches neuronales nestine positives a facilité leur caractérisation, l'étude de leur rôle potentiel suite à un dommage ainsi que les stimuli affectant leur prolifération et leur différenciation. Comme déjà mentionné, la génération de cellules différenciées à partir des cellules souches neuronales nestine positives nécessite un remodelage du contenu cytosquelettique en filaments intermédiaires. Ainsi, la section suivante aborde les filaments intermédiaires étudiés dans ce travail.

#### 4.3.1.5.A Filaments intermédiaires

Le cytosquelette est composé de microtubules, de microfilaments et de filaments intermédiaires. Il existe plus de cinquante filaments intermédiaires qui sont regroupés en six classes (Steinert PM et Liem RK, 1990; Steinert PM et al., 1999). La GFAP, les neurofilaments et la nestine sont des filaments intermédiaires faisant partie de la classe III, IV et VI respectivement.

#### *Nestine*

Le filament nestine (220 kDa) a été initialement identifié en 1985 par Hockfield et McKay et son expression a été détectée majoritairement dans les cellules souches neuronales présentes au niveau du tube neural (Hockfield S et McKay RD, 1985; Frederiksen K et McKay RD, 1988). Au cours du développement ainsi que du processus de différenciation cellulaire, l'expression de nestine diminue

pour être remplacée par d'autres filaments intermédiaires soit par le GFAP et les neurofilaments au niveau des astrocytes et des neurones respectivement.

Lors de son identification, la protéine nestine était considérée comme un marqueur exclusif des cellules souches neuronales. Par contre, plusieurs études ont mis en évidence sa présence dans différents organes n'appartenant pas au système nerveux. Ainsi, elle est exprimée dans le cœur embryonnaire ainsi que dans le muscle squelettique (Lendahl U et al., 1990; Sejersen T et Lendahl U, 1993; Kachinsky AM et al., 1995). Chez l'adulte, une réexpression de nestine est observée suite à la dénervation des muscles squelettiques (Vaitinen S et al., 1999). Nestine est aussi exprimée dans les cellules stellaires du foie suite à leur activation ainsi que dans les cellules tumorales (glioblastomes) et l'endothélium tumoral au niveau du cerveau adulte (Dahlstrand J et al., 1992; Niki T et al., 1999). De plus, suite à un dommage au niveau du muscle squelettique, du cerveau, du cœur et de la peau, les vaisseaux présents dans la région affectée expriment nestine (Mokrý J et al., 2004; Amoh Y et al., 2004; Shin HY et al., 2008; Mokrý J et al., 2008; Cízková D et al., 2009). Par conséquent, l'ensemble de ces études suggère que nestine n'est pas seulement un marqueur spécifique des cellules souches neuronales du système nerveux. Son expression est aussi associée aux cellules en division et en différenciation (changement phénotypique). L'expression de nestine dans les différents tissus est dépendante de l'activation de différents introns (expression spécifique au type cellulaire). Le gène de nestine en comporte trois et seul le rôle de deux introns a été déterminé. Le premier intron est responsable de l'expression de nestine dans le muscle (cardiaque ou squelettique) en développement ainsi que dans

l'endothélium angiogénique tandis que le deuxième est responsable de son expression au niveau des cellules souches neuronales (Zimmerman L et al., 1994; Aihara M et al., 2004).

Quelques rôles de nestine sont documentés dans la littérature. Lors du processus de différenciation, nestine contribue à l'apparition des filaments intermédiaires de la cellule mature du tissu spécifique. Ceci a lieu suite à son co-assemblage (copolymérisation) avec les autres classes de filaments intermédiaires. De plus, nestine interagit avec les microfilaments et les microtubules reliant les trois composantes du cytosquelette. Par conséquent, elle stabilise la structure de la cellule (Steinert PM et al., 1999; Sahlgren CM et al., 2001). De plus, cette propriété procure un rôle additionnel pour nestine et ce, au niveau de la division cellulaire. Au cours de la mitose, sa phosphorylation est augmentée amenant ainsi à une réorganisation de ce filament. En effet, sa phosphorylation module son long domaine C terminal facilitant l'interaction protéine-protéine des différentes composantes du cytosquelette au cours de la division cellulaire.

### *Glial fibrillary acidic protein et Neurofilament*

La GFAP est une protéine de 51 kDa retrouvée au niveau des astrocytes du système nerveux central et périphérique (Bignami A et al., 1972; Yen SH et Fields KL, 1981; Dahl D et al., 1982). Suite à un dommage, les astrocytes matures deviennent réactifs, prolifèrent et s'hypertrophient. De plus, ces astrocytes réexpriment nestine qui est un marqueur retrouvé, lors du développement, au cours



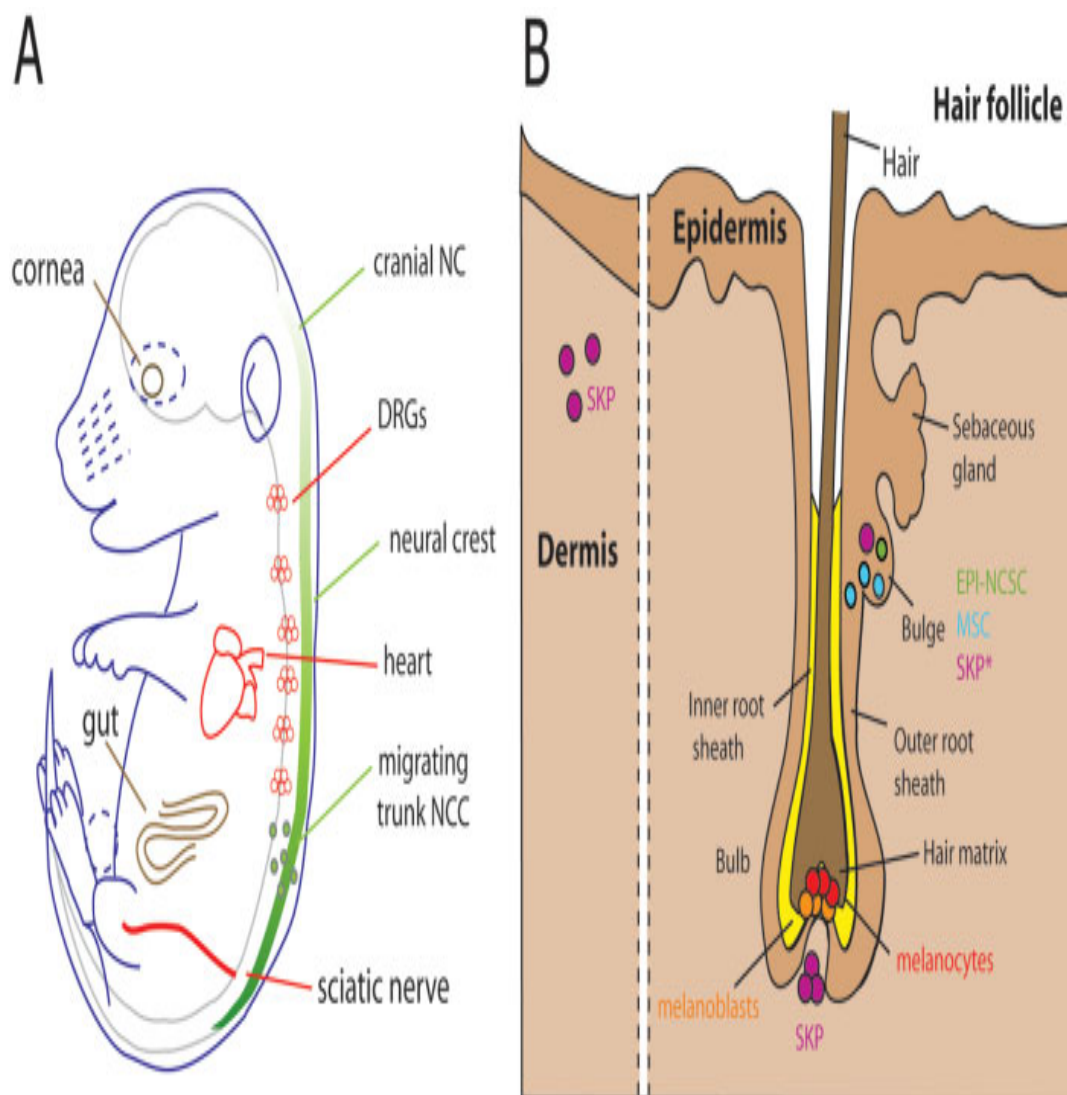
de la différenciation des cellules souches neuronales en astrocytes (Clarke SR et al., 1994). Ces cellules nestine positives/GFAP positives jouent un rôle dans la neuroprotection et la formation de la cicatrice gliale (Frisén J et al., 1995; Lin RC et al., 1995).

Les neurofilaments sont présents au niveau du système nerveux central et périphérique et ils sont composés du NF-L (light, 68 kDa), NF-M (medium, 145 kDa) et NF-H (heavy, 200 kDa). Les neurofilaments sont retrouvés au niveau des neurites, des dendrites ainsi que des larges axones (Liem RK et al., 1978; Schlaepfer WW et Freeman LA, 1978).

#### 4.3.1.6 Les cellules souches neuronales nestine positives du système nerveux périphérique; cellules progénitrices de la peau

Les cellules progénitrices nestine positives ont été identifiées au niveau du derme et du follicule pileux de mammifères jeunes et adultes (Toma JG et al., 2001; Amoh Y et al., 2004; Toma JG et al., 2005). Ces cellules sont appelées "*skin progenitor cells*" (SKPs) et proviennent de la crête neurale. La crête neurale est la source de plusieurs cellules souches embryonnaires et adultes retrouvées au niveau du système nerveux central et périphérique (Figure 15) (Delfino-Machín M et al., 2007). En plus de nestine, les SKPs expriment d'autres marqueurs des cellules souches de la crête neurale notamment les facteurs transcriptionnels slug, snail et

sox9. Sox9 est un modulateur de la survie, de la prolifération et de la différenciation des cellules souches. De plus, sox9 ainsi que slug et snail sont des facteurs impliqués dans la transition épithéliale-mésenchymale. Au niveau embryonnaire, cette transition est importante dans plusieurs processus comme la formation du mésoderme et la migration des cellules de la crête neurale (Seymour PA et al., 2007; Niessen K et al., 2008; Poché RA et al., 2008). Suite à leur transplantation au niveau des voies de migration de la crête neurale d'un embryon de poulet, les SKPs se déplacent vers plusieurs cibles périphériques dont notamment la peau (Fernandes et al., 2004). Ainsi, il semble qu'au cours du développement, les SKPs migrent vers la peau où elles persistent jusqu'à l'âge adulte. Ces cellules sont multipotentes et démontrent une grande plasticité. Elles prolifèrent sous forme de sphères et génèrent *in vitro* des neurones, des cellules gliales et des cellules musculaires lisses. En parallèle, le groupe de Amoh a utilisé des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP) sous le contrôle du deuxième intron de nestine pour démontrer le rôle des cellules souches nestine positives du follicule pileux dans l'angiogenèse *de novo*. Lors de la réparation cutanée, ces cellules GFP positives situées dans le follicule pileux se différencient en cellules endothéliales et forment des vaisseaux positifs à deux marqueurs endothéliaux (CD31 et von Willebrand factor) (Amoh Y et al., 2004).



**Figure 15. Localisation des cellules souches neuronales dérivées de la crête neurale**

Représentation schématique d'un embryon de rongeurs montrant les organes à partir desquels les cellules souches dérivées de la crête neurale ont été isolées. B) Illustration présentant les cellules souches dérivées de la crête neurale au niveau du derme et du follicule pileux notamment les cellules souches mélanocytes (melanocyte stem cells, MSCs), les cellules progénitrices de la peau (skin-progenitor cells, SKPs) et les cellules souches neuronales de l'épiderme (epidermal neural crest stem cells, EPI-NCSCs) (Tiré de Delfino-Machin M et al., 2007)

## **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES**

Suite à un infarctus du myocarde, la région endommagée est remplacée par une cicatrice fibreuse, connue sous le nom de fibrose de réparation. Plusieurs événements cellulaires sont associés à cette fibrose. Tout d'abord, les myofibroblastes, issus de la trans-différenciation des fibroblastes, sont responsables de la synthèse et du dépôt des protéines de la matrice extracellulaire notamment le collagène. Ensuite, une réponse angiogénique a lieu et elle est nécessaire à la survie cellulaire au niveau du myocarde endommagé. Récemment, deux événements cellulaires additionnels associés à la formation de la cicatrice ont été identifiés soient l'innervation sympathique de la cicatrice ainsi que la migration des cellules nestine positives vers la région infarctée. Jusqu'à présent, le rôle de ces deux dernières composantes dans le processus de cicatrisation est méconnu. Ainsi, le but général des travaux présentés dans cette thèse est, en premier lieu, la caractérisation des cellules nestine positives ainsi que la détermination de leur origine et de leur rôle biologique au niveau du remodelage cicatriciel. En deuxième lieu, l'implication des fibres sympathiques neurofilament-M positives dans la cicatrisation adéquate de la région infarctée est examinée. Nos études reposent sur plusieurs hypothèses dont :

- 1- Les cellules nestine positives présentes dans le cœur sont des cellules souches neuronales qui proviennent de la crête neurale lors du développement embryonnaire.
- 2- Les cellules nestine positives représentent un substrat cellulaire pour la formation de nouveaux vaisseaux et contribuent ainsi à la réponse angiogénique. De plus, les cellules nestine positives participent à la réinnervation sympathique de la région infarctée.

- 3- Une perturbation de la cicatrisation, causée par un traitement avec le corticostéroïde dexaméthasone, est associée en partie à une diminution de la densité des fibres sympathiques neurofilament-M positives.

**Chapitre 2 PRÉSENCE DE CELLULES SOUCHES  
NEURONALES NESTINE POSITIVES DANS LE  
MYOCARDE NORMAL ET ENDOMMAGÉ DE  
RATS**

Suite à un dommage ischémique, le processus de cicatrisation est initié rapidement afin de maintenir l'intégrité structurelle du myocarde et d'éviter la rupture de la paroi ventriculaire. Pendant longtemps, la cicatrice cardiaque était considérée comme un tissu acellulaire n'étant composé que de fibres de collagène. De nos jours, il est connu que cette cicatrice est un tissu dynamique, métaboliquement actif, innervé par des fibres sympathiques et composé de myofibroblastes et de cellules vasculaires soient les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. En 2005, notre laboratoire a été le premier à identifier des cellules possédant un petit corps cellulaire doté d'extensions dans les cultures de cicatrice cardiaque. Ces cellules exprimant le filament intermédiaire nestine rappellent le phénotype de cellules souches neuronales (Lendahl U et al., 1990; Drapeau J et al., 2005). Nous démontrons aussi, dans cette publication, la présence *in vivo* et *in vitro* des trois types cellulaires appartenant au tissu neuronal (neurones, astrocytes et oligodendrocytes). En parallèle, nous montrons que le traitement de cellules de pheochromocytome PC12 avec le milieu provenant d'une culture de cicatrice cardiaque stimule la formation de neurites. Ce phénomène est également observé lorsque ces cellules sont traitées avec le facteur neurotrophique NGF. Ces résultats suggèrent que la cicatrice cardiaque représente un milieu particulier pouvant potentiellement influencer le comportement des cellules nestine positives présentes dans la région infarctée.

L'identification du rôle biologique de ces cellules représente le but ultime de notre laboratoire. Par contre, il était essentiel d'examiner en premier lieu le phénotype et l'origine de ces cellules ainsi que leur répartition dans le cœur sain et



endommagé. L'étude suivante explore ces points et poursuit en parallèle la caractérisation de ces cellules afin de déterminer si cette population est distincte des autres cellules souches régénératrices adultes proposées par la littérature notamment les cellules dérivées de la moelle osseuse. Notre hypothèse est que les cellules nestine positives ne sont pas dérivées de la moelle osseuse mais elles sont endogènes au cœur.

# **Resident nestin<sup>(+)</sup> neural-like cells and fibres were detected in the normal and damaged rat myocardium**

Viviane El-Helou,<sup>1,2</sup> Jocelyn Dupuis,<sup>2</sup> Cindy Proulx,<sup>1,2</sup>  
Jessica Drapeau,<sup>1,2</sup> Robert Clement,<sup>1</sup> Hugues Gosselin,<sup>1</sup>  
Louis Villeneuve<sup>1</sup>, Louis Manganas,<sup>3</sup> AND Angelino Calderone<sup>1,2\*</sup>

**Hypertension 2005;46;1219-1225**

<sup>1</sup>Department of Physiology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>3</sup>Department of Neurology, Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA

Short title: Neural stem cells in the rat heart

Word count of manuscript (including references, figures, legends): 5,380

Word count for abstract: 242

Total number of figures: 5

## ABSTRACT

The present study examined whether nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells detected in the scar tissue of rats 1-week after myocardial infarction (MI) were derived from bone marrow and/or resident cells of the normal myocardium. Irradiated male Wistar rats transplanted with  $\beta$ -actin promoter-driven, green fluorescent protein (GFP)-labeled, unfractionated bone marrow cells were subjected to coronary artery ligation. Three weeks after MI, GFP-labeled bone marrow cells were detected in the infarct region and a modest number associated with nestin immunoreactivity. The paucity of green fluorescent protein<sup>(+)</sup>/nestin<sup>(+)</sup> cells in the scar provided the impetus to explore whether neural-like stem cells were derived from cardiac tissue. Nestin mRNA and immunoreactivity were detected in the normal rat myocardium and transcript levels increased in the damaged heart following myocardial infarction. In primary passage cardiac-derived neural cells, filamentous nestin staining was associated with a diffused cytoplasmic glial fibrillary acidic protein signal. Unexpectedly, in the viable myocardium, numerous nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures of varying lengths were detected and observed in close proximity to neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres. The infarct region was likewise innervated and the preponderance of neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres appeared to be physically associated with nestin<sup>(+)</sup> fibre-like structures. These data highlight the novel observation that the normal rat heart contained resident nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> neural-like stem cells, fibre-like structures and nestin mRNA levels were increased in response to myocardial ischemia. Cardiac tissue-derived neural stem cell migration to the infarct

region and concomitant nestin<sup>(+)</sup> fibre-like innervation represent obligatory events of reparative fibrosis in the damaged rat myocardium.

**Key words:** Rat, heart, investigative techniques, molecular biology, myocardial infarction

## INTRODUCTION

Fibroblast migration, subsequent transformation to a myofibroblast phenotype and concomitant nerve fibre innervation represent putative events of reparative fibrosis following cardiac injury.<sup>1-3</sup> Subsequent studies performed in the damaged dog and rat myocardium revealed that fibres innervating the infarct region stained positive for neurofilament-M and tyrosine hydroxylase.<sup>4,5</sup> The prevailing thesis stated that neuronal innervation of the scar occurred at least in part via the growth of pre-existing fibres originating from the stellate ganglion and facilitated by the retrograde transport of the neurotrophin nerve growth factor.<sup>5</sup> However, nerve fibre growth may concomitantly proceed via the recruitment of neural stem cells. The intermediate filament protein nestin was identified as a marker of adult neural stem cells located in the central nervous system (CNS), and under the appropriate culture conditions differentiated to either glial cells and/or neurons.<sup>6-8</sup> Recently, co-expression of glial fibrillary acidic protein in nestin<sup>(+)</sup> neural stem cells was recognized as additional phenotype of neural progenitors.<sup>9,10</sup> In the infarct region of the damaged rat myocardium and cultured scar-derived cells, nestin immunoreactivity was identified in neural-like cells with numerous processes and/or extensions.<sup>5</sup> The latter data was consistent with the premise that the infarct region contained neural cells that exhibited a stem cell phenotype.<sup>5</sup> Furthermore, nestin and neurofilament-M proteins were co-expressed in a few scar-derived neural cells.<sup>5</sup> Although the latter data did not directly confirm that nestin<sup>(+)</sup> neural-like cells differentiated to a neuronal phenotype, the observation was consistent with a progenitor role.

Several studies have demonstrated that multipotent stem cell differentiation is not exclusively lineage dependent but in part influenced by the environment. Under the appropriate culture conditions, skin- and skeletal muscle-derived multipotent stem cells can differentiate to either a mesodermal or neural stem cell phenotype.<sup>11,12</sup> A similar paradigm was reported for adult bone marrow derived stromal cells.<sup>13</sup> With regard to scar residing nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells, their tissue source remains presently undefined. The current literature supports the premise that bone marrow cells may have migrated to the scar and subsequently differentiated to a neural stem cell phenotype after exposure to the infarct milieu.<sup>12-14</sup> Alternatively, nestin<sup>(+)</sup> neural cells may represent an endogenous stem cell population residing in the normal heart. Consistent with the latter concept, Beltrami *et al.* demonstrated that the myocardium contained c-kit<sup>(+)</sup> multipotent cardiac stem cells.<sup>15</sup> Thus, the primary objective of the present study was to elucidate whether nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells detected in the scar of post-MI rats were either bone marrow and/or cardiac derived.

## **METHODS**

**MI model and isolation of scar-derived cells.** Myocardial infarction 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 and left ventricular function was measured 1 week after surgery, as previously described.<sup>5</sup> The use and care of laboratory rats were conducted to the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

Isolation of neural cells and (myo)fibroblasts from the normal left ventricle, non-infarcted left ventricle and infarct region was performed as previously described.<sup>5</sup>

**Mouse follicle-derived neural stem cells and brain-derived astrocytes.** Mouse follicle-derived neural stem cells were isolated from the entire skin of the dorsum of a P30 C57/Bl6 mouse. Cells were removed and digested in trypsin (1 hr, 30°C) and subsequently treated with 2 mg/mL collagenase (2 hrs, 37°C). Cells were then grown in poly 2-hydroxyethyl methacrylate-coated dishes in Neurocult Basal Media with 10% Proliferation medium (Stem Cell Technologies) and supplemented with epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 (20 ng/mL added every two days; Sigma).<sup>16</sup> After neurosphere formation (~14 days), the spheres were collected and plated in uncoated plates containing 7% FBS for 1-3 days. Plated cells were subsequently subjected to immunofluorescence. Brain-derived astrocytes were provided by Dr. L-E Trudeau (Université de Montréal, Dept. de Pharmacologie).<sup>17</sup>

**Injection of Green Fluorescent Protein (GFP)-labelled unfractionated bone marrow cells.** Normal male Wistar rats (8-10 weeks) were irradiated (7.2 Gy, ~10 minutes; l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal, Canada) and 24 hours later,  $\beta$ -actin promoter-driven GFP-labelled<sup>18</sup> unfractionated adult rat bone marrow cells ( $50 \times 10^6$  cells/mL) were injected into the jugular vein. Flow cytometry of peripheral blood isolated from 4-5 week post-transplanted rats revealed that  $94 \pm 2\%$  of the leukocyte population were GFP<sup>(+)</sup>. Five weeks after transplantation, grafted rats were subjected to coronary artery occlusion and euthanized 3 weeks after myocardial infarction (n=3).

**Isolation of total RNA, reverse transcriptase polymerase chain reaction and**

**Real-Time PCR.** Total RNA isolated from the normal, and damaged myocardium of 1-week post-myocardial infarct rats was isolated by a modification of guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction method, as previously described.<sup>19</sup> The reverse transcriptase reaction contained 5 ng/ $\mu$ L of total RNA (each sample), M-MLV reverse transcriptase (800 U; Invitrogen), RNaseOUT (40 U; Invitrogen), random hexamer primers (0.04 U; Amersham Biosciences), dNTPs (0.5 mM; MBI Fermentas), and supplied optimal buffers. The reaction protocol consisted of three successive incubation steps at 1) 25°C for 10 min, 2) 37°C for 50 min, and 3) 70°C for 15 min. Real-time PCR was performed on 2.5 ng of cDNA template, containing the appropriate primers (300 nM) and the SYBR Green PCR master mix (Applied BioSystems). Primers for each gene were obtained from distinct exons that spanned an intron by using the Ensembl Genome Browser program ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). The sequence specificity of each primer was verified with the Blast program derived from the National Centre for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The primers used were as follows rat atrial natriuretic peptide; forward 5'-AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3' and reverse 5'-ATTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'; rat nestin; forward 5'-TGCAGGCCACTGATAAGTTCCA-3' and reverse 5'-TTCTCCTGCTCCAGGGCTTCCA-3'; rat collagen  $\alpha_1$  Type 3 forward; 5'-ggacctggtttcttcaccc-3' and reverse 5'-AGGTAGTTGCATCCCAATTCA-3' and rat  $\beta$ -actin forward 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3' and reverse 5'-



GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'. Appropriate negative controls were used for each experiment.

**Immunofluorescence staining.** The heart was excised, immersed directly in 2-methyl butane (temperature maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$ ), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Primary passage scar-derived cells were isolated from 5 or 6 pooled scars of variable size from 1-week post-myocardial infarct rats, plated on glass coverslips and examined 3-10 days following initial plating. Cells cultured either from the normal or non-infarcted left ventricle were obtained from 2-3 pooled hearts. Immunofluorescence on tissue (cryostat sections of  $14\ \mu\text{m}$  thickness;  $n=4-6$  of either normal or myocardial infarct rats) and cultured cells ( $n=3-5$  separate experiments) was performed, as previously described.<sup>5</sup> Antibodies included mouse monoclonal anti-nestin (1:400-500; Chemicon), mouse monoclonal anti-myelin specific oligodendrocyte protein (1:400; Chemicon), rabbit polyclonal anti-glial fibrillary acidic protein (1:500; Chemicon), rabbit polyclonal anti-neurofilament-M (1:500; Chemicon), rabbit polyclonal anti-Nogo-A (1:200; Alpha Diagnostic International, Inc), rabbit polyclonal anti-c-kit (1:25-50; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-connexin-43 (1:200; Chemicon), mouse monoclonal anti- $\alpha$  sarcomeric actin (1:200; Sigma), and anti-rabbit green fluorescent protein conjugated to Alexa Fluor 555 (1:50; Molecular Probes). Secondary antibodies were a goat anti-mouse IgG conjugated to rhodamine (1:250-500; Molecular Probes) and a goat anti-rabbit IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (1:500; Jackson Laboratories). Immunofluorescence signal was detected at either a 10X- or 63X-oil 1.4 NA DIC plan apochromat objective mounted on a Zeiss Axiovert 100M confocal microscope.

A fluorescence signal was not detected when either fixed cells or tissue were incubated with conjugated secondary antibody alone. Panels B and D of Figure 5 represent maximum projections derived from a z-stack of 0.16  $\mu\text{m}$  slices.

### **Statistics**

Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M and (*n*) represented either the number of rats used per experiment or the number of independent preparations of scar-derived cells. Data was evaluated by either by a Student's unpaired t-test or an ANOVA following by a Newman-Keuls post-hoc test. A value of  $P < 0.05$  considered statistically significant.

## RESULTS

### GFP-labelled bone marrow-derived cells migrated to the infarct region

GFP-labelled, unfractionated bone marrow cells were detected in the scar region of 3-week post-myocardial infarct irradiated male Wistar rats and appeared interspersed among nestin<sup>(+)</sup> cells (Fig. 1). Among the population of grafted GFP<sup>(+)</sup> bone marrow cells identified in the infarct region,  $36\pm 12\%$  exhibited nestin immunoreactivity. GFP and nestin co-expression was detected in  $22\pm 5\%$  of the total population of scar-residing nestin<sup>(+)</sup> cells. The paucity of GFP<sup>(+)</sup>/nestin<sup>(+)</sup> cells in the infarct region suggested that the majority of scar residing nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells were derived from tissue other than bone marrow. In the normal left ventricle, nestin mRNA was expressed and nestin<sup>(+)</sup> immunoreactive cells were detected throughout the myocardium intercalated among well-defined cardiac myocytes (Fig. 1). At a higher magnification, nestin<sup>(+)</sup> cells were associated with apparent processes and/or extensions (Fig. 1). The latter data were confirmed in vitro, as nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells with distinct processes and/or extensions were cultured from the normal myocardium (Fig. 2). Unexpectedly, organized nestin filaments were detected in a paucity of fibroblasts and the intensity of the signal was variable (Fig. 2). Indeed, the preponderance of fibroblasts did not express nestin. In fibroblasts that exhibited nestin immunoreactivity, the signal was significantly weaker compared with that in nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells (Fig. 2). One week after complete coronary artery ligation, scar formation was associated with diminished left ventricular function (Table 1). In the non-infarcted left ventricle and infarct region, atrial natriuretic

peptide, collagen  $\alpha_1$  and nestin mRNA levels were significantly increased compared with sham rats (Fig. 3). Analogous to what was observed in the normal myocardium, nestin immunoreactivity was detected in neural-like stem cells cultured from the non-infarcted left ventricle and infarct region (data not shown).<sup>5</sup> Likewise, a weak immunoreactive nestin signal was observed in a modest number of (myo)fibroblasts (data not shown).

Modest number of c-kit<sup>(+)</sup> cells were observed randomly scattered in the normal rat myocardium and detected intercalated among connexin-43<sup>(+)</sup> cardiac myocytes (Fig. 1). C-Kit immunoreactivity was not observed in nestin<sup>(+)</sup> cells residing in the normal myocardium (Fig. 1). Moreover, the morphological phenotype of nestin<sup>(+)</sup> (processes and/or extensions) and c-kit<sup>(+)</sup> cells (small round shaped) were distinct. As previously stated, and in contrast to c-kit<sup>(+)</sup> cells, nestin staining was detected throughout the normal myocardium (Fig. 1). Likewise, in primary passage scar-derived cells, c-kit immunoreactivity was not detected in nestin<sup>(+)</sup> neural-like cells (data not shown).

### **Nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells expressed glial fibrillary acidic protein**

In the normal myocardium, glial fibrillary acidic protein immunoreactivity was detected in nestin<sup>(+)</sup> cells intercalated among cardiac myocytes (Fig. 4). The co-expression of glial fibrillary acidic protein and nestin was reaffirmed in primary passage neural-like cells derived from the normal myocardium, non-infarcted left ventricle and infarct region and morphologically resembled putative neural stem cells isolated from the dermis of juvenile mice (e.g. numerous processes) (Fig. 4).<sup>11</sup> However, glial fibrillary acidic protein was not organized in a filamentous pattern but

was diffused in the cytoplasm and in some cells a nuclear signal was observed (Fig. 4). Likewise, in cultured mouse follicle-derived neural stem cells, nestin intermediate filaments were co-incident with a diffused glial fibrillary acidic protein signal in the cytoplasm and an intense perinuclear stain (Fig. 4).<sup>20</sup> A nuclear glial fibrillary acidic protein signal was also detected in a modest number of mouse follicle-derived neural stem cells. By contrast, glial fibrillary acidic protein intermediate filaments were evident in rat brain-derived astrocytes, whereas a nuclear signal was absent (Fig. 4). Last, a weak, diffused cytoplasmic and nuclear glial fibrillary acidic protein signal was observed in fibroblasts derived from the normal and infarcted myocardium (Fig. 4).<sup>5</sup> Despite the absence of a nonspecific signal in the nucleus after incubation of the cells with fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody alone, the specificity of the nuclear glial fibrillary acidic protein signal remained equivocal.

**Nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures were detected in normal and infarcted rat hearts and scar-derived oligodendrocytes synthesized Nogo-A**

Nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> cells detected in the normal myocardium, peri-infarct region, and infarct regions of 1-week post-myocardial infarct rats were associated with distinct processes and/or extensions of varying lengths. In the normal and viable myocardium of 1-week post-myocardial infarct rats, the length of numerous nestin<sup>(+)</sup> processes was similar to that of innervating neurofilament-M fibres (Fig. 5). Moreover, randomly throughout the myocardium, nestin<sup>(+)</sup> fibre-like structures and neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres were detected in close proximity. Likewise, nestin<sup>(+)</sup> fibre-like structures and neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres of similar lengths were

detected innervating the infarct region. However, in contrast to what was observed in viable myocardium, the preponderance of neurofilament-M fibres detected in the infarct region appeared to be physically associated with nestin<sup>(+)</sup> fibre-like structures (Fig. 5).

In the CNS, the family of peptides designated Nogo (neural outgrowth inhibitors) were characterized as inhibitors of axonal growth and were predominantly synthesized by oligodendrocytes.<sup>21</sup> In neural-like cells cultured from the scar region of 1-week post-myocardial infarct rats, an oligodendrocyte phenotype was identified as delineated by the expression of myelin specific oligodendrocyte protein (MOSP). Moreover, MOSP<sup>(+)</sup> cells and nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> neural stem cells were morphologically distinct (Figs. 2, 4 & 5). Consistent with previous studies, Nogo-A expression was abundant in MOSP<sup>(+)</sup> neural cells (Fig. 5). By contrast, a weak diffused Nogo-A signal was detected in myofibroblasts. Whether this latter signal represented significant Nogo-A synthesis by myofibroblasts remains equivocal.

### **Non-neural nestin expression in the infarcted myocardium**

Although the intermediate filament protein nestin was defined as a marker of neural stem cells, expression was also reported in cardiac progenitor cells and endothelial cells during active angiogenesis.<sup>22-24</sup> In the scar region of 1-week post-myocardial infarct rats, vessels of variable size were identified and lumen diameter (long axis) varied between 34 to 193  $\mu\text{m}$ . Nestin immunoreactivity was detected in endothelial cells of vessels with an average lumen diameter of  $62 \pm 7 \mu\text{m}$  (range 34-

87) (Fig. 2). By contrast, in larger vessels (lumen diameter; 150 to 193  $\mu\text{m}$ ) with intact endothelium, nestin staining was either weakly expressed or not detected (data not shown). Nestin immunoreactivity was not observed in vascular smooth muscle cells (Fig. 2). Last, nestin staining was not detected in cardiac myocytes of either the normal heart or remote regions of the noninfarcted left ventricle (Figs. 1 & 4). However, exclusively within the peri-infarct region, nestin immunoreactivity was observed in some but not all cells that exhibited a striated cardiac myocyte phenotype (Fig. 2). Striated cardiac myocytes detected in the peri-infarct region stained positive for  $\alpha$ -sarcomeric actin and connexin-43 (data not shown).

## DISCUSSION

A recent study demonstrated that bone marrow derived stromal stem cells cultured under the appropriate in vitro conditions differentiated to a neural stem cell phenotype.<sup>13</sup> To examine the latter premise, unfractionated GFP-labelled bone marrow cells were transplanted in irradiated adult male Wistar rats that were subsequently subjected to coronary artery ligation. In 3-week post- myocardial infarct rats, GFP-labelled bone marrow cells were detected in the infarct region, and nestin immunoreactivity was observed in a modest number of grafted bone marrow cells. Collectively, these data highlight the chemotactic nature of the infarct region and further support the premise that the milieu was capable of promoting nestin expression in a limited population of grafted bone marrow-derived cells. It remains to be confirmed whether bone marrow  $\text{GFP}^{(+)}/\text{nestin}^{(+)}$  cells represent putative neural

stem cells. Alternatively, the possibility that cell fusion contributed in part to the appearance of bone marrow GFP<sup>(+)</sup>/nestin<sup>(+)</sup> cells in the infarct region could not be excluded. Regardless of the mechanism, the modest number of bone marrow-derived GFP<sup>(+)</sup>/nestin<sup>(+)</sup> cells could not account for the plethora of nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells residing in the scar region.

The paucity of nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> cells detected in the infarct region provided the impetus to examine whether scar residing nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells were heart-derived cells. Indeed, the latter premise was indirectly confirmed as GFP expression driven by the nestin second-intron enhancer was identified in the mouse heart.<sup>24</sup> Nestin mRNA was detected in the normal rat heart, immunoreactivity was observed intercalated among well-defined cardiac myocytes throughout the myocardium and nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells were isolated from the left ventricle. In contrast to multipotent cardiac stem cells<sup>15</sup>, c-kit immunoreactivity was not observed in nestin<sup>(+)</sup> cells detected in the normal rat myocardium. In response to coronary artery ligation, nestin mRNA was induced in the non-infarcted left ventricle and further increased in the scar. In the damaged heart of post-myocardial infarct rats, increased nestin mRNA expression either may reflect induction of the transcript and/or may be secondary to cell proliferation. Thus, the limited number of nestin<sup>(+)</sup>/GFP<sup>(+)</sup> bone marrow cells detected in the scar region of grafted myocardial infarcted rats support the premise that resident neural stem cells derived from the viable myocardium migrated to and populated the infarct region. Last, modest nestin staining was unexpectedly detected in a paucity of fibroblasts derived from the viable



myocardium and infarct region and intensity was markedly lower, as compared to neural-like stem cells.

In the CNS, glial fibrillary acidic protein expression was detected in neural progenitor cells,<sup>9,10</sup> and in the present study, immunoreactivity was observed in nestin<sup>(+)</sup> cells detected in the normal and infarcted myocardium. The latter phenotype was likewise confirmed in cultured neural-like stem cells and their morphology (e.g. numerous long processes) resembled those of nestin<sup>(+)</sup> neural stem cells isolated from the skin of juvenile mice.<sup>11</sup> However, in both cardiac tissue- and scar-derived primary passage nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells, glial fibrillary acidic protein immunoreactivity was cytoplasmic and diffused. Likewise, a diffused cytoplasmic and perinuclear glial fibrillary acidic protein signal was observed in cultured mouse follicle-derived neural stem cells expressing nestin intermediate filaments.<sup>20</sup> In cultured rat brain derived astrocytes, glial fibrillary acidic protein intermediate filaments were evident. Thus, analogous to CNS- and mouse follicle-derived neural stem cells, glial fibrillary acidic protein was expressed in cardiac tissue- and scar-derived primary passage nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells. The diffused cytoplasmic pattern of glial fibrillary acidic protein expression may represent an underlying feature distinguishing neural stem cells and mature astrocytes. Last, tissue damage and subsequent scar formation in the CNS were associated with the recruitment of glial fibrillary acidic protein-expressing astrocytes that re-expressed both vimentin and nestin, and were redefined as reactive astrocytes.<sup>7,25</sup> In our previous study, scar-derived neural cells that co-expressed nestin and glial fibrillary acidic protein were considered reactive astrocytes.<sup>5</sup> However, based on the findings of the present study,

the coexpression of nestin and unorganized glial fibrillary acidic protein may instead reflect a neural-like stem cell phenotype.

Coincident with individual neural-like stem cells, nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures of varying lengths were detected innervating the normal myocardium, non-infarcted left ventricle and infarct region. Likewise, in the dentate gyrus of the adult mouse brain, nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> processes were detected.<sup>10</sup> Two populations of nestin<sup>(+)</sup> cells were identified and defined as type I and type II. The type I cells were glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> with longer processes and considered early neural progenitors.<sup>10</sup> Moreover, randomly throughout the normal and viable myocardium of 1-week post-myocardial infarct rats, nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures and neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres were detected in close proximity. Likewise, nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures and neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres of similar lengths were also observed innervating the infarct region. However, the preponderance of neurofilament-M fibres detected in the infarct region appeared to be physically associated with nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures. Presently, it remains equivocal as to whether the latter physical association identified in the infarct region represents an interaction between two distinct fibres or coexpression of nestin/glial fibrillary acidic protein and neurofilament-M filaments within the same fibre.

Scar innervation may have occurred by growth of pre-existing nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> and/or neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres residing in the viable myocardium of the infarcted rat heart. At least with regard to neurofilament-M fibre growth, the

latter process was suggested to occur via locally synthesized neurotrophins.<sup>4,5</sup> However, fibre innervation of the scar may be partially antagonized by the local production of axonal growth inhibitors. In the CNS, Nogo-A synthesis by oligodendrocytes attenuated axonal growth and/or sprouting.<sup>21</sup> In primary passage scar-derived cells, nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> and MOSP<sup>(+)</sup> cells were morphologically distinct and Nogo-A expression was abundantly expressed in the latter cells. Thus, the extent of either nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> and/or neurofilament-M fibre innervation of the infarct region may reflect a dynamic interaction between locally synthesized neurotrophins and axonal growth inhibitors.

In addition to neural stem cells, nestin expression was also detected in pancreatic stem cells, endothelial cells during active angiogenesis and myocardial-derived c-kit<sup>(+)</sup> progenitor cells.<sup>15,22-24,26</sup> Consistent with an angiogenic response during reparative fibrosis<sup>27</sup>, numerous vessels of various size were identified in the scar region of 1-week post-myocardial infarct rats. Nestin staining was detected in endothelial cells of vessels with an average lumen diameter of 62  $\mu\text{m}$  whereas a signal was absent in the surrounding vasculature. These data further reaffirm the premise that nestin expression may highlight ongoing angiogenesis and elevated mRNA levels detected in the infarct region did not exclusively reflect neural stem cell recruitment and/or proliferation. Last, scattered in the peri-infarct region, some but not all striated cardiac myocytes stained positively for nestin. By contrast, nestin immunoreactivity was not detected in cardiac myocytes residing in either the normal left ventricle or remote regions of the non-infarcted left ventricle. It is tempting to speculate that the modest number of striated nestin<sup>(+)</sup> cardiac myocytes detected

exclusively in the peri-infarct region were derived from c-kit<sup>(+)</sup> multipotent cardiac stem cells.<sup>15,23</sup>

The present study has provided the novel observation of resident neural-like stem cells in the normal rat heart identified by the coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein. Nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures were detected in the normal myocardium, the noninfarcted left ventricle, and the infarct region. The morphology and phenotype of cardiac tissue-derived nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like structures resembled early neural progenitors identified in the dentate gyrus of the adult mouse brain tentatively implicated in neurogenesis.<sup>10</sup> Whether a similar paradigm is prevalent in the normal and infarcted myocardium remains to be elucidated. Thus, cardiac-derived neural stem cell migration to the infarct region and concomitant nestin<sup>(+)</sup>/glial fibrillary acidic protein<sup>(+)</sup> fibre-like innervation represent obligatory events of reparative fibrosis in the damaged rat myocardium.

### **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". Drs. Calderone and Dupuis are "Chercheur-Boursiers Senior" funded by the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec". Dr. Louis Manganas is funded by the NIH (# NIH-NRSA T32DK07521-15). Last, we thank Dr Grigori Enikolpov for his insightful thoughts and valuable assistance.

## LEGENDS

**Figure 1.** *Grafted GFP<sup>(+)</sup> bone marrow cells in the infarct region, nestin and c-kit staining in the normal myocardium.*

(A & C) Grafted GFP<sup>(+)</sup> bone marrow cells (red fluorescence) were detected in the scar region of 3 week post-myocardial infarct rats interspersed among nestin<sup>(+)</sup> cells (green fluorescence). A few of GFP<sup>(+)</sup> bone marrow cells were associated with nestin immunoreactivity (indicated by arrows). (B & D) Phase contrast pictures of panels A & C, respectively. (E) Nestin<sup>(+)</sup> immunoreactive cells were detected throughout the normal rat myocardium intercalated among cardiac myocytes. (F) Phase contrast photomicrograph of E. (G) Nestin staining (red fluorescence) was detected in the normal rat myocardium and immunoreactive cells were associated with apparent processes and/or extensions. C-kit staining was not detected. (H) C-kit (green fluorescence) staining was observed in modest number of cells (indicated by arrow) randomly scattered in the normal rat myocardium and interspersed among connexin-43<sup>(+)</sup> (red fluorescence) cardiac myocytes. Scale bar; Panels A, B, C, D, G & H, 10  $\mu\text{m}$ ; Panels E & F, 100  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** *Nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells isolated from the normal myocardium and immunoreactivity in non-neural cells.*

(A) Nestin filaments were observed in neural cells cultured from the normal left ventricle. Nestin staining of surrounding fibroblasts was not evident. (B) The fluorescent signal in panel A significantly amplified to highlight modest nestin immunoreactivity in the surrounding fibroblasts (indicated by asterisk). (C) Nestin

immunoreactivity was detected in endothelial cells (highlighted by box) of vessels localized in the infarct region with a lumen diameter of  $62\pm 7$   $\mu\text{m}$ . Nestin staining was not detected in vascular smooth muscle. In the surrounding environment, numerous nestin<sup>(+)</sup> neural-like cells were present. (D) Phase contrast photomicrograph of C. (E) Nestin staining was detected in randomly scattered striated cardiac myocytes located exclusively in the peri-infarct region (indicated by asterisks) interspersed among nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells (indicated by arrows). (F) Phase contrast photomicrograph of E. Scale bar; 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3.** *Gene expression in 1 week post-myocardial infarct rats.*

(A) Atrial natriuretic peptide (ANP) and collagen  $\alpha_1$  mRNA levels were significantly increased in the noninfarcted left ventricle (NILV) and infarct region compared with sham rats. (B) Nestin mRNA levels were increased in 1 week post-myocardial infarct rats. (\*) denotes  $P < 0.05$  versus sham and (+) denotes  $P < 0.05$  versus sham and noninfarcted left ventricle.

**Figure 4.** *Glial fibrillary acidic protein expression in nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cells.*

(A) Nestin immunoreactivity in the normal left ventricle stained positive for (B) glial fibrillary acidic protein as reflected by the appearance of a (C) yellow fluorescence. (D) Phase contrast photomicrograph of A, B and C. (E) Nestin<sup>(+)</sup> neural-like stem cell cultured from the noninfarcted left ventricle coexpressed (F) unorganized glial fibrillary acidic protein. In surrounding fibroblasts (indicated by asterisk), a weak cytoplasmic and nuclear signal of glial fibrillary acidic protein was observed. (G) Nestin<sup>(+)</sup> intermediate filaments were detected in cultured mouse

follicle-derived neural stem cells and associated with a (H) diffused cytoplasmic and intense perinuclear glial fibrillary acidic protein signal. (I) By contrast, glial fibrillary acidic protein intermediate filaments were detected in rat brain-derived astrocytes. Scale bar; Panels A, B, C, D, E, F, & I, 20  $\mu\text{m}$ ; Panels G & H, 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5.** *Nestin fibre-like structures detected in the normal and infarcted myocardium.*

(A) Randomly scattered throughout the normal left ventricle, nestin fibre-like structures (red fluorescence) were detected in close proximity (highlighted in the box) to neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres (green fluorescence). (B) The region within the box in panel A was magnified and distinct nestin<sup>(+)</sup> fibre-like structures were evident and appeared closely associated with neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres. (C) In the infarct region, the preponderance of neurofilament-M (green fluorescence) fibres appeared to be closely associated with nestin fibre-like structures (red fluorescence) (highlighted in the box). (D) The region within the box in panel C was magnified and in contrast to the normal left ventricle, neurofilament-M<sup>(+)</sup> fibres innervating the scar appeared physically associated with nestin<sup>(+)</sup> fibre-like structures. (E) Nogo-A immunoreactivity was detected in (F) MOSP<sup>(+)</sup> neural cells isolated from the infarct region. Modest Nogo-A staining was detected in myofibroblasts (indicated by asterisks). Scale bar; Panels A & C, 100  $\mu\text{m}$ ; Panels B, D, E, & F, 20  $\mu\text{m}$ . Panels B & D represent a maximum projection derived from a z-stack of 0.16  $\mu\text{m}$  slices.

## REFERENCES

1. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: A dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* 2000;46:250-256.
2. Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res.* 1998;38:545-548.
3. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Fate of nerve fibers in necrotic, healing and healed rat myocardium. *Lab Invest.* 1990;63:490-501.
4. Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, Fishbein MC, Sharifi B, Chen PS. Mechanisms of cardiac nerve fiber sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res.* 2004;95:76-83.
5. 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;205:51-62.
6. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60:585-595.
7. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999;96:25-34.
8. Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, Salman NJ, White F, Fillmore H, Bullock MR. Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2003;183:406-417.



9. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol.* 2004;469:311-324.
10. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003;23:9357-9366.
11. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biol.* 2001;3:778-784.
12. Romero-Ramos M, Vourc'h P, Young HE, Lucas PA, Wu Y, Chivatakarn O, Zaman R, Dunkelman N, El-Kalay MA, Chesselet MF. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. *J Neurosci Res.* 2002;69:894-907.
13. Wislet-Gendebein S, LePrince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci.* 2003;116:3295-3302.
14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-705.
15. 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;114:763-776.
16. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization and use of stem cells from

the CNS. *Ann Rev Neurosci.* 1995;18:159-192.

17. St. Gelais F, Legault M, Bourque MJ, Rompre PP, Trudeau LE. Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci.* 2004;24:2566-2574.

18. Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:779-85.

19. Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Rouleau JL, Calderone A. AT<sub>1</sub> receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1485-1494.

20. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:9958-9961.

21. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signalling, and correlation with axon regeneration. *Glia.* 2004;46:225-251.

22. Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, Takeuchi T. Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest.* 2004;84:1581-1592.

23. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002;346:5-15.
24. Amoh Y, Yang M, Linga L, Reynoso J, Bouvet M, Moossa AR, Katsuoka K, Hoffman RM. Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2005;65:5352-5357.
25. Lin RC, Matesic DF, Marvin M, McKay RD, Brustle O. Re-expression of the intermediate nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis.* 1995;2:79-85.
26. Maria-Engler SS, Correa-Giannella ML, Labriola L, Krogh K, Colin C, Lojudice FH, Aita CA, de Oliveira EM, Correa TC, da Silva IC, Genzini T, de Miranda MP, Noronha IL, Vilela L, Coimbra CN, Mortara RA, Guia MM, Eliaschewitz FG, Sogayar MC. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *J Endocrinol.* 2004;183:455-467.
27. 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.

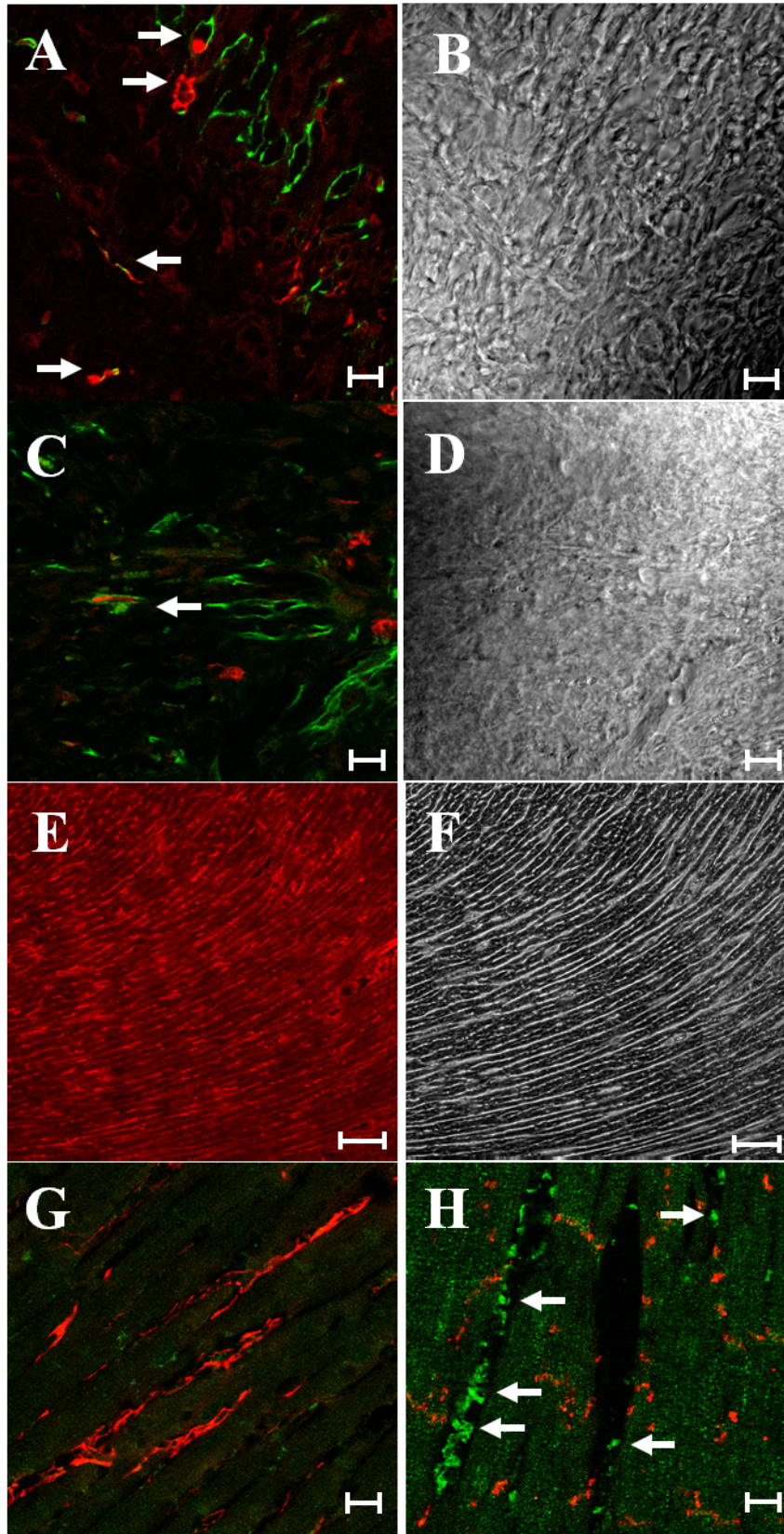
**Figure 1**

Figure 2

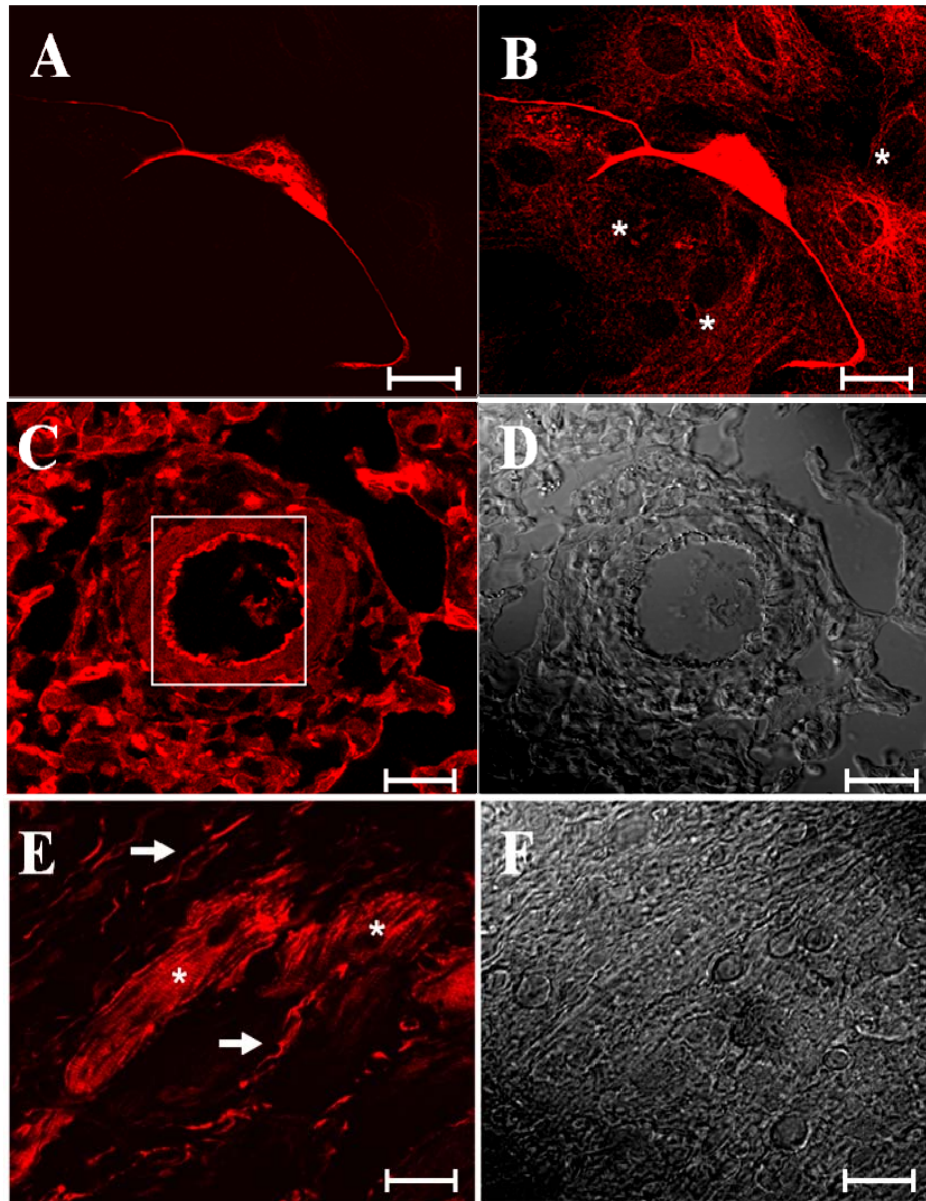
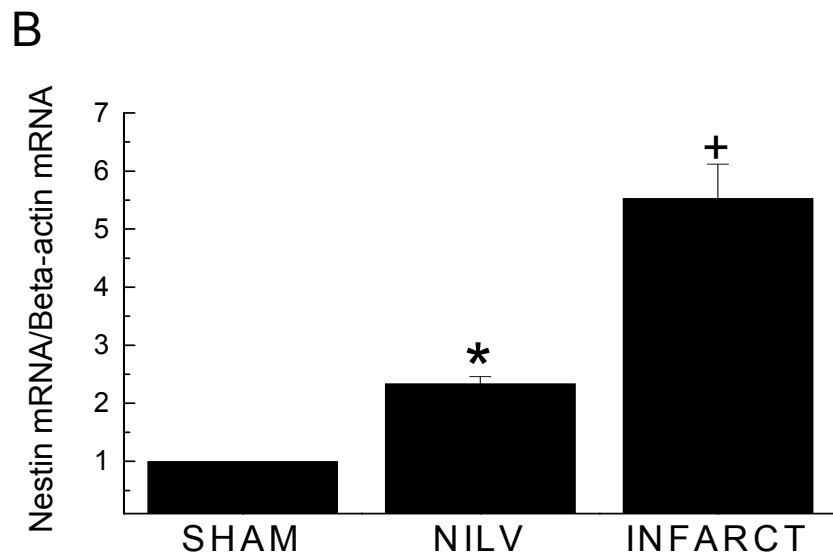
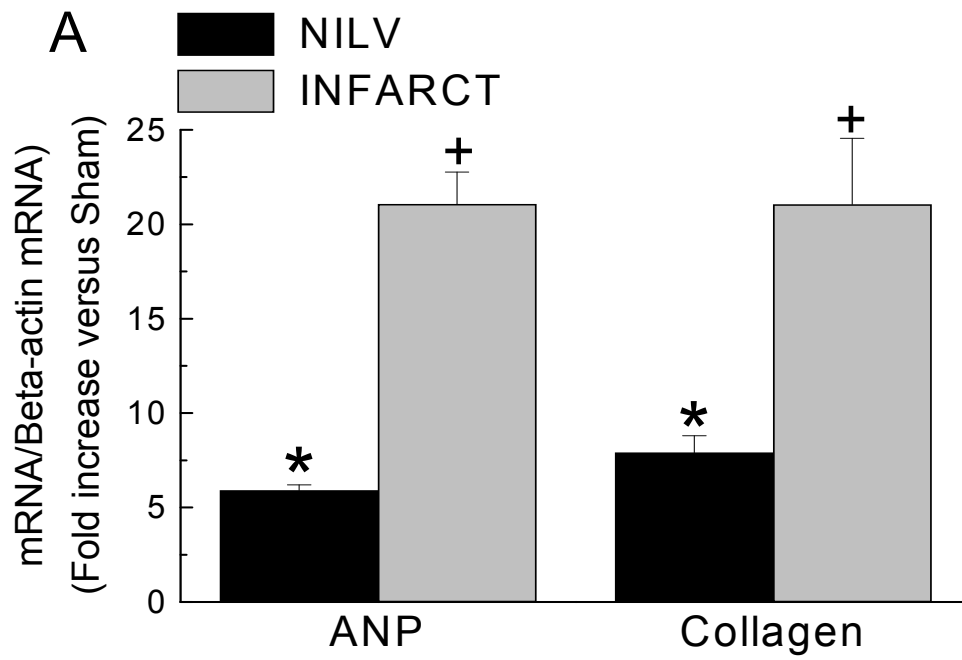
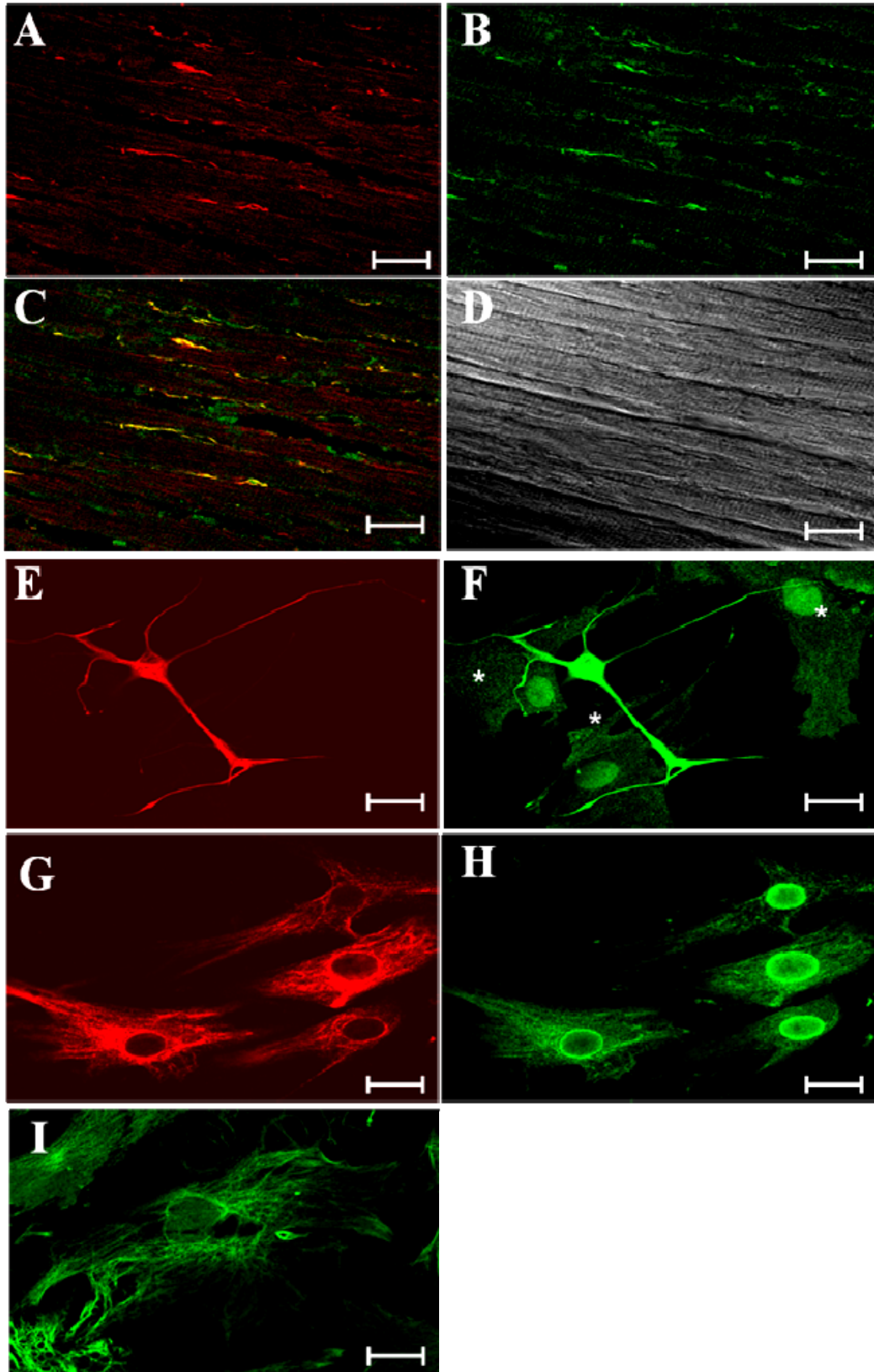
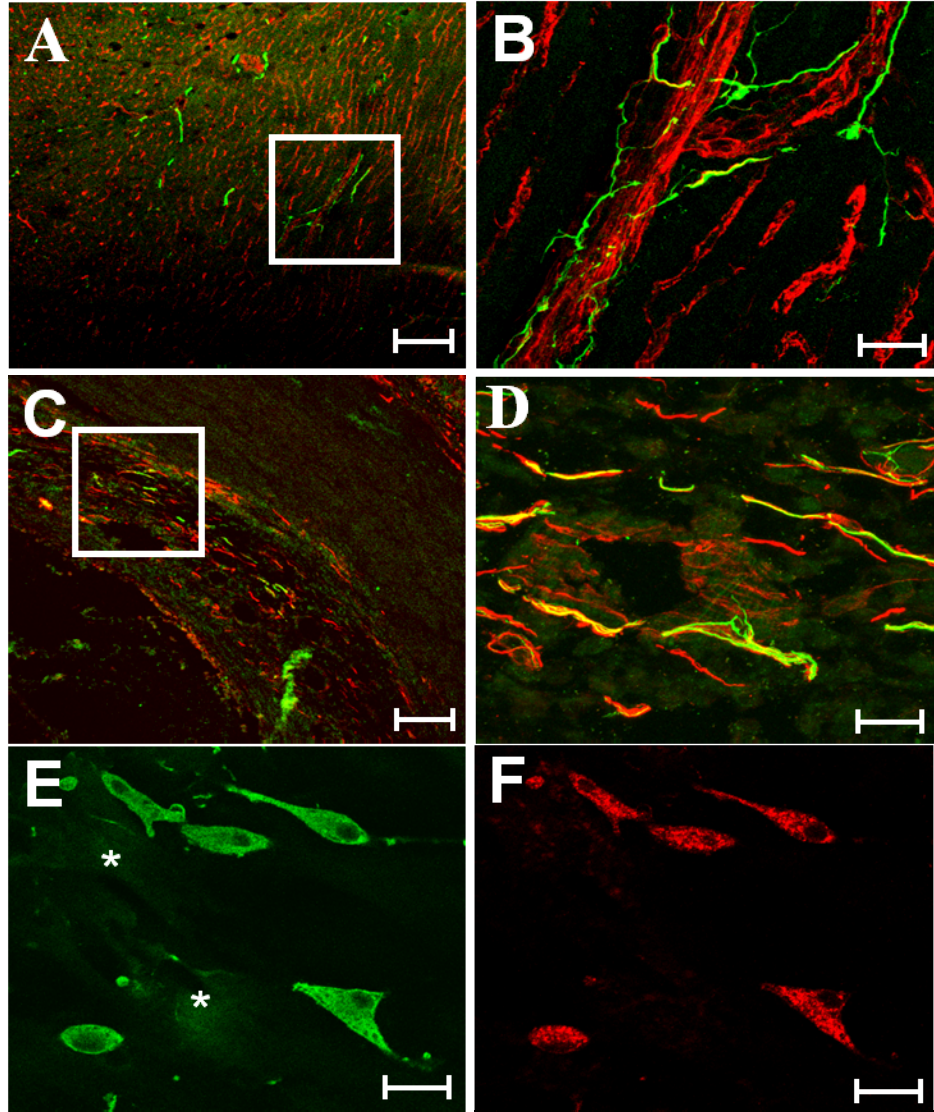


Figure 3



**Figure 4**

**Figure 5**



**Table 1. Heart weight and contractile function**

Group	BW (g)	LVW/BW (mg/g)	RVW/BW (mg/g)	SW/BW (mg/g)	LVSP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	LV +dP/dt (mm Hg/sec)	LV -dP/dt (mm Hg/sec)
Sham ( <i>n</i> =5)	361±16	1.41±0.07	0.48±0.02	--	156±9	10±2	7540±435	6270±409
MI ( <i>n</i> =5)	371±9	1.24±0.03	0.50±0.05	0.25±0.01 <sup>*</sup>	133±7	16±1	5920±348 <sup>*</sup>	4120±275 <sup>a</sup>

BW, body weight; LVW, left ventricle weight; RVW, right ventricle weight; SW, scar weight; LVSP, left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; +dP/dt, rate of contraction; -dP/dt, rate of relaxation. Other abbreviations are as defined in text. Data are presented as mean±S.E.M., (\*)  $P < 0.05$  versus, Sham, and (*n*) number of rats.

**Chapitre 3 RÔLE DES CELLULES SOUCHES  
NEURONALES NESTINE POSITIVES DANS  
L'INNERVATION SYMPATHIQUE ET  
L'ANGIOGENESE SUITE À UN INFARCTUS DU  
MYOCARDE**

Dans l'étude précédente, nous démontrons la présence endogène de cellules souches nestine positives dans le cœur normal adulte. Elles possèdent des caractéristiques rappelant le phénotype des cellules souches neuronales nestine positives du cerveau et des cellules progénitrices nestine positives de la peau. Suite à un infarctus du myocarde, les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques sont aussi détectées dans le cœur infarci. De plus, les niveaux de nestine sont augmentés dans la région infarctée et non infarctée, ce qui suggère une participation probable de ces cellules au remodelage ventriculaire suite à un dommage. Au niveau du système nerveux central et périphérique, les cellules souches neuronales participent à la formation de nouveaux vaisseaux dans la région endommagée (Oishi K et al., 2004; Wurmser AE et al., 2004; Amoh Y et al., 2004). Ces données suggèrent que, suite à un infarctus du myocarde, les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques pourraient jouer un rôle potentiel dans la réponse angiogénique.

Dans la première étude, nous avons également observé une innervation de la cicatrice cardiaque par des fibres sympathiques NF-M positives. Nous montrons que la majorité des fibres nestine positives présentes dans la région infarctée sont associées physiquement aux fibres sympathiques NF-M positives contrairement à celles retrouvées dans la région non infarctée. Le rôle de ces fibres nestine positives dans le cœur est inconnu. Au niveau du système périphérique, il a été démontré que les cellules de Schwann projettent des fibres nestine positives qui servent de guide pour la croissance axonale des fibres sympathiques lors de la régénération des nerfs

(Anton ES et al., 1994; Hayworth CR et al., 2006; Kang H et al., 2007). Ainsi, ces résultats suggèrent que les fibres nestine positives pourraient servir de guide pour la croissance des fibres sympathiques dans la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde.

L'intérêt principal de l'étude suivante est l'isolation des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques dans le but de les caractériser. Nous examinons l'hypothèse que les cellules nestine positives ont un phénotype de cellules souches neuronales et proviennent de la crête neurale lors du développement. De plus, suite à un dommage ischémique, ces cellules jouent un rôle dans le remodelage cicatriciel. Nous présentons des résultats relatifs à l'origine des cellules nestine positives ainsi que leur potentiel rôle physiologique dans le remodelage cicatriciel suite à un infarctus du myocarde et ce, au niveau de l'angiogenèse et de la réinnervation sympathique de la région infarctée. De façon intéressante, nous avons également observé la présence de ces cellules au niveau des cœurs infarctés humains soulignant ainsi leur intérêt clinique.

# **The Rat Heart Contains a Neural Stem Cell Population; Role in Sympathetic Sprouting and Angiogenesis**

Viviane El-Helou, Pauline C Beguin, John Assimakopoulos, Robert Clement, Hugues Gosselin, Ramon Brugada, Anne Aumont, Jeffrey Biernaskie, Louis Villeneuve, Tack Ki Leung, Karl John Lionel Fernandes, and Angelino Calderone

**Journal of Molecular and Cellular Cardiology 45 (2008) 694–702**

From the Départements de Physiologie (V.E.H., P.C.B., J.A., R.C., H.G., A.C.), Médecine (R.B.), Pathologie et Biologie Cellulaire (A.A., K.J.L.F.), Pharmacologie (A.C.), Université de Montréal, Montréal, Québec; Montreal Heart Institute (V.E.H., P.C.B., J.A., R.B., L.V., T.K.L., A.C.), Montreal, Quebec; Developmental and Stem Cell Biology Group, Hospital for Sick Children (J.B.), Toronto, Ontario;

**Short title:** Cardiac neural stem cells

**Word count:** 6433

## ABSTRACT

Nestin-expressing cells were identified in the normal rat heart characterized by a small cell body and numerous processes and following an ischemic insult migrated to the infarct region. The present study was undertaken to identify the phenotype, origin and biological role of nestin-expressing cells during reparative fibrosis. A neural stem cell phenotype was identified based on musashi-1 expression, growth as a neurosphere, and differentiation to a neuronal cell. Using the Wnt1-cre; Z/EG transgenic mouse model, which expresses EGFP in embryologically-derived neural crest cells, the reporter signal was detected in nestin-expressing cells residing in the heart. In infarcted human hearts, nestin-expressing cells were detected in the viable myocardium and the scar and morphologically analogous to the population identified in the rat heart. Following either an ischemic insult or the acute administration of 6-hydroxydopamine, sympathetic sprouting was dependent on the physical association of neurofilament-M immunoreactive fibres with nestin-positive processes emanating from neural stem cells. To specifically study the biological role of the subpopulation in the infarct region, neural stem cells were isolated from the scar, fluorescently labelled and transplanted in the heart of 3-day post-MI rats. Injected scar-derived neural stem cells migrated to the infarct region and were used as a substrate for *de novo* blood vessel formation. These data have demonstrated that the heart contains a resident population of neural stem cells derived from the neural crest and participate in reparative fibrosis. Their manipulation could provide an alternative approach to ameliorate the healing process following ischemic injury.

**Keywords:** Heart; Neural stem cells; Neural crest; Sympathetic fibre sprouting;  
Angiogenesis

## INTRODUCTION

We recently reported the existence of a resident population of nestin-expressing cells intercalated among cardiac myocytes in the normal rat heart that were recruited to the scar following an ischemic insult [1]. These cells were characterized by a small cell body and numerous processes and morphological distinct from scar myofibroblasts [1]. Based on their morphology and nestin expression, these cardiac cells may represent a neural stem cell population. However, additional seminal features of neural stem cells include the expression of the RNA binding protein musashi-1, growth as a floating sphere and differentiation to a neuronal cell *in vitro* [2]. Furthermore, the embryonic origin of cardiac nestin-expressing cells remains presently undefined, albeit the neural stem cell population identified in hair follicles was neural crest-derived [3,4]. Lastly, it remains unknown whether the human heart contains nestin-expressing cells that are morphologically analogous to the population identified in the rat heart and present in the scar following an ischemic insult.

Sympathetic fibre sprouting and innervation of the damaged region represent conserved events of tissue healing [5-7]. In the ischemically damaged heart, neurofilament-M immunoreactive fibres are known to innervate the infarct region [1,8-10], but the underlying mechanism(s) implicated in sympathetic sprouting remain undefined. In the case of denervated skeletal muscle, a paradigm of axonal growth was observed that involved resident Schwann cells [11,12]. Following skeletal muscle denervation, terminal Schwann cells located at the motor endplate send out nestin immunoreactive extensions or processes to neighbouring cells that act



as a scaffold and/or guidance mechanism to support axonal growth [11,12]. Since processes emanating from nestin-expressing cells innervate the infarct region, these findings raise the possibility that these cells may behave as terminal Schwann cells and participate in sympathetic fibre sprouting following cardiac injury. An additional trait of CNS and peripheral neural stem cells is their ability to differentiate to either an endothelial and/or vascular smooth muscle cell [13-15]. It remains unknown whether scar-residing nestin-expressing cells possess a similar property.

The aims of the present study consist of determining the phenotype and origin of rat cardiac nestin-expressing cells and confirm whether an analogous population resides in human cardiac tissue. Second, examine the role of nestin-expressing cells in sympathetic fibre sprouting following ischemic injury and pharmacological denervation of the rat heart. Lastly, identify whether a subpopulation of nestin-expressing cells isolated from the infarct region may represent a novel substrate for *de novo* blood vessel formation.

## METHODS

**Animal Models and Neurosphere Formation by Scar-Derived Cells.** Myocardial infarction was induced in male Sprague-Dawley rats (12-14 weeks; Charles Rivers, Canada) following the ligation of the left anterior descending coronary artery, as previously described [1]. Ischemia/reperfusion injury in male Sprague-Dawley rats was induced by occluding the coronary artery for a period of 45 minutes and the animals were sacrificed 7 days later (n=3). To assess the origin of nestin expressing cells in the heart, a Cre-Lox transgenic mouse model was used in which EGFP was expressed in tissues derived from the neural crest [16,17]. These Wnt-cre;Z/EG mouse heart tissues were kindly provided by Dr. Freda Miller (Hospital for Sick Children, Toronto, ON). To assess sympathetic fibre sprouting, 6-hydroxydopamine (Sigma; IV injection of 100 mg/kg/day for three days) was administered to male adult Sprague-Dawley rats (n=10) and sacrificed 2 days after treatment. Neurospheres were generated from scar-derived cells isolated from the infarct region of 1 week post-MI male rats. Briefly, 5-6 infarcts of variable size were digested with 0.1% trypsin (InVitrogen, Eugene, OR) in HBSS overnight at 4°C. Cells were subsequently recovered by repeated digestions in 10 ml of 0.1% collagenase (Type II; InVitrogen). To generate neurospheres,  $3 \times 10^6$  cells were re-suspended in 30 ml DMEM:F12 (3:1) media containing 2% B27, 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 40 ng/ml basic-fibroblast growth factor (bFGF) and plated in a T75 culture flask. The media was changed every 2-3 days and neurospheres were permitted to grow for 2-3 weeks. To examine their differentiation, neurospheres were mechanically dissociated and individual cells plated for 5-10 days in serum-free

defined differentiation media (StemCell Technologies; Vancouver, BC). In parallel experiments, scar-derived cells were re-suspended in 7% heat inactivated FBS and cultured for 7-10 days, as previously described [1]. The use and care of laboratory animals was according to the Canadian Council for Animal Care and all animal studies were approved by the Animal Care Ethics Committee of the Montreal Heart Institute.

**Human Tissue.** Cardiac tissue samples (left ventricle and infarct region) were obtained from patients (3 male, 1 female) who died either  $\leq 1$  week ( $n=2$ ) or 3 months ( $n=2$ ) following myocardial infarction. Patients ( $65 \pm 11$  years old; range 30-83 years old) were characterized with established coronary artery disease and left ventricular hypertrophy and 2 patients had a history of a previous MI. The use of human cardiac tissue was approved by the Clinical Ethics board of the Montreal Heart Institute.

**In Vivo Injection of Neurosphere-Derived Cells Isolated from the Scar Region of 1-Week Post-MI Rats.** Two-three weeks after plating, neurospheres were dissociated and  $1 \times 10^6$  cells injected with a Hamilton syringe (30 G; 10  $\mu$ L volume) at 4 distinct sites in the viable myocardium of 3-day post-MI rats ( $n=2$ ). To track their migration and subsequent differentiation *in vivo*, injected cells were labelled with the non-diffusible fluorescent cell tracker CM-DiI (Invitrogen; excitation/emission; 553/570 nm) [2]. Seven days following injection, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg  $\text{kg}^{-1}$ ; Rogarsetic, Toronto, ON) and xylazine (10 mg  $\text{kg}^{-1}$ ; Rompun, Cambridge, ON), the heart removed, immersed in 2-methyl butane and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used for immunofluorescence.

**Immunofluorescence.** Primary passage scar-derived cells or neural stem cells isolated from neurospheres were plated on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde prior to staining. Following their isolation, neurospheres were plated in 7% FBS for 24 hours to allow attachment and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde prior to staining. Immunofluorescence on rat or mouse cardiac tissue (cryostat sections; 14  $\mu\text{m}$  thickness), isolated cells and neurospheres were performed as previously described [1]. In hearts grafted with CM-DiI labelled cells, a minor modification was implemented as 0.5% Triton was replaced with 0.3% Tween in the blocking solution, and 0.1% Triton was replaced with 0.05% Tween during primary and secondary antibody incubation, respectively. Antibodies employed include mouse monoclonal anti-nestin (1:500 in rat, 1:100 in mice; Chemicon, Temecula, CA); mouse monoclonal anti-eNOS (1:100, BD Biosciences, Mississauga, ON); mouse monoclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:100; Sigma, St. Louis, MO); mouse monoclonal anti- $\beta$ III-tubulin (1:300; Covance, Berkeley, CA); rabbit polyclonal anti-connexin-43 (1:200; Santa Cruz, CA); rabbit polyclonal anti-neurofilament-M (1:500; Chemicon), rabbit polyclonal anti-desmin (1:200; abcam, Cambridge, MA); rabbit polyclonal anti-sox9 (1:200; abcam); rabbit polyclonal anti-musashi-1 (1:100; Chemicon); and a chicken polyclonal anti-green fluorescent protein (1:800; Chemicon). Secondary antibodies (1:600-800; InVitrogen) used were either a goat anti-mouse IgG, a goat anti-rabbit IgG or a goat anti-chicken IgG conjugated to either Alexa-488 (emission wavelength, 520 nm) or Alexa-546 (emission wavelength, 570 nm). To stain the nucleus, cells were initially treated with RNase (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 20 minutes at 37°C) and then incubated with the fluorescent

label to-pro<sup>3</sup> (Invitrogen; 1.5  $\mu$ M; emission wavelength, 661 nm). Non-specific staining was determined following the addition of either an isotype control antibody (mouse IgG, 5  $\mu$ g/ml; rabbit IgG 17  $\mu$ g/ml) or the secondary antibody alone. The concentration of each isotype control was equivalent to the highest concentration of antibody employed. Immunofluorescence staining was visualized with either a 10X- or 63X-oil 1.4 NA DIC plan apochromat objective mounted on a Zeiss Axiovert 100M confocal microscope. The program LSM 5 Image Browser (Zeiss) was used to calculate the density of nestin-expressing cells ( $\text{mm}^2$ ) in the normal rat heart and neurofilament-M immunoreactive fibres ( $\mu\text{m}^2$ ) and these data were normalized to the surface area of the left ventricle in a field of 0.85  $\text{mm}^2$  (6-10 fields per tissue section were examined). The LSM 5 Image Browser was also used to calculate vessel surface area and consisted of measuring the long and short axis of the lumen. Figures 1H, 1I, 4, 5A, 5B, 5F represent projections (LSM 510 software; Zeiss) derived from a z-stack (voxel size of 143x143x250 nm in XYZ) of a 14  $\mu$ m cryosection. The Z-stack image was deconvolved (Huygens Professional 3.0; SVI, Netherlands) and the final image reconstructed with the LSM 510 software.

Human myocardial samples were embedded in paraffin, and serial cryostat sections of 6  $\mu$ m were prepared. Sections were deparaffinized and hydrated (100%, 95% and 70% ethanol) and subsequently treated to the antigen retrieval method. Briefly, sections were incubated in 10 mM Sodium Citrate (pH 6) at a temperature of 100°C for 25-30 minutes, allowed to return to ambient temperature and then rinsed with PBS. Tissue sections were blocked in 2% Normal Goat Serum (NGS) and 2% BSA, for 1 hour. Thereafter, tissue was incubated with the rabbit polyclonal anti-

connexin 43 (1:200; Santa Cruz) antibody and mouse monoclonal anti-human nestin (1:100; Santa Cruz) antibody overnight at 4°C in 1% NGS and 1% BSA. Nuclear labelling and secondary antibodies employed were identical to that described above.

**Real time PCR.** Total RNA isolation and real time PCR were performed as previously described [1]. The primers used are depicted in Table 1 and data was normalized to rat  $\beta$ -actin.

### **Statistics**

All values are expressed as the mean $\pm$ SEM, a students' unpaired t-test was used to determine neurofilament-M density and peptide growth factor mRNA expression and a *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant (GraphPad Prism, San Diego, CA).

## RESULTS

### **Nestin-expressing cells in the rat heart exhibit a neural stem cell phenotype**

Nestin-expressing cells were detected intercalated among cardiac myocytes throughout the ventricle and atria of the normal rat heart (Figures 1A, 1B). In the left ventricle of a normal rat heart (n=4), nestin-immunoreactive cells occupied a density of  $10.7 \pm 0.7\%$ . These cardiac nestin-expressing cells were characterized by a small cell body and numerous processes and morphologically analogous to cells identified in the infarct region (Figures 1C & 2A) [1]. To elucidate whether nestin-expressing cells in the rat heart exhibit a neural stem cell phenotype, musashi-1 expression, neurosphere formation and differentiation to a neuronal cell *in vitro* were examined. Nuclear musashi-1 staining was detected in nestin-expressing cells intercalated among cardiac myocytes in the normal left ventricle (Figures 1D & 1E) and infarct region (data not shown). Musashi-1 staining was also observed in the nucleus of cardiac myocytes (Figures 1D & 1E). Second, we examined whether the subpopulation of nestin-expressing cells residing in the infarct region exhibited *in vitro* characteristics consistent with a neural stem cell phenotype. Nestin-expressing cells were identified in primary passage scar-derived cells plated in 7% FBS for 7-10 days (Figure 2A). Neurosphere formation was observed exclusively following the plating of primary passage scar-derived cells in serum-free media supplemented with bFGF/EGF (Figures 2C & 2D). Within 3-5 days after plating, small clusters were observed attached to the plate, subsequently detached, grew in size, and cells residing in these neurospheres were nestin immunoreactive (Figures 2C & 2D). The plating of neurosphere-derived cells in a defined serum-free differentiation media led to the

appearance of neurofilament-M and the concomitant loss of nestin immunoreactivity (Figures 2E & 2F). Furthermore,  $\beta$ III-tubulin immunoreactivity was identified in neurofilament-M<sup>(+)</sup> cells, thereby substantiating their neuronal phenotype (Figures 2G & 2H).

### **The human myocardium contains nestin-expressing cells**

To assess whether the infarcted human heart contains nestin-expressing cells, the viable and scar region of patients that died either  $\leq 1$  week or 3-months after myocardial infarction were examined. Nestin-expressing cells characterized by a small cell body with numerous processes were detected intercalated among cardiac myocytes in the viable myocardium and in the scar of post-MI patients (Figures 3A, 3B, 3D). Nestin staining was also observed in endothelial cells lining scar-residing small calibre vessels (Figure 3C) and in a paucity of cells that displayed a cardiac myocyte-like phenotype preferentially bordering the peri-infarct region (Figure 3D).

### **Neural crest origin of cardiac nestin-expressing cells**

As a first step to identify their origin, the expression of neural crest stem cell-associated genes was examined. In rat primary passage scar-derived cells (data not shown) and the normal left ventricle (n=4), nestin mRNA ( $1.16 \pm 0.009$ ) was coincident with the expression of several neural crest stem cell-associated genes including sox9 ( $1.2 \pm 0.008$ ), snail ( $1.21 \pm 0.01$ ) and slug ( $1.49 \pm 0.003$ ) whereas the pax3 transcript was undetectable. Sox9 immunoreactivity was observed in the nucleus of nestin-expressing cells in both the neonatal and adult rat heart (Figures 1F, 1G & 1H). Furthermore, a sox9 immunoreactive signal was observed in the nucleus



of cardiac myocytes (Figures 1F, 1G & 1H). Thus, since it is possible that nestin-expressing cells in the heart may have both a neural and non-neural origin, we employed the Wnt1-Cre transgenic mouse to identify whether these cells were neural crest-derived. Akin to the rat heart, nestin-expressing cells with nuclear sox9 staining were detected intercalated among cardiac myocytes in both the neonatal (Figure 1I) and adult mouse heart (data not shown) and were morphologically analogous to the population identified in the rat and human heart. In Wnt1-Cre mice, EGFP immunoreactivity was detected in the cytoplasm of numerous nestin-expressing cells (Figure 4). Moreover, nestin<sup>(-)</sup>/EGFP<sup>(+)</sup> cells were also observed in the heart of Wnt1-Cre transgenic mice.

#### **Physical interaction of sympathetic fibres and nestin immunoreactive processes**

Following either complete coronary artery ligation or ischemia/reperfusion injury, neurofilament-M immunoreactive sympathetic fibres were detected innervating the peri-infarct/infarct region (Figures 5A & 5B). Furthermore, sympathetic fibres innervating the scar were physically associated with nestin immunoreactive processes emanating from neural stem cells (Figures 5A & 5B), whereas this anatomical paradigm was not observed in the normal myocardium (Figures 1A & 5C). In addition, numerous nestin immunoreactive processes identified in the infarct region were not physically associated with sympathetic fibres (Figures 5A & 5B). Lastly, a paucity of physically associated neurofilament-M fibres and nestin processes were observed in close proximity to small calibre blood vessels in the peri-infarct/infarct region (Figures 5A & 5B).

Based on the novel anatomical phenotype reported in the ischemically damaged rat heart, it is tempting to speculate that neural stem cells residing in the viable myocardium may act as a scaffold and/or guidance mechanism to support sympathetic fibre sprouting [11,12]. To test this premise, we examined whether sympathetic fibre sprouting could occur in the rat heart after the acute administration of 6-hydroxydopamine and if this process was characterized by the physical interaction of nestin immunoreactive processes and neurofilament-M fibres. Two days post 6-hydroxydopamine injection of normal adult male rats, sympathetic fibre degeneration was evident in the heart and confirmed by the significant reduction of neurofilament-M fibre density (Figures 5D & 6). However, a paucity of intact sympathetic fibres was detected in the heart of 6-hydroxydopamine treated rats and neurofilament-M immunoreactive processes were physically associated with nestin positive extensions (Figures 5E & 5F). Lastly, myocardial NGF mRNA expression was significantly increased in 6-hydroxydopamine treated rats whereas neuregulin-1 mRNA levels were unchanged (Figure 6).

### **Scar-derived neural stem cells represent a cellular substrate for *de novo* blood vessel formation**

The following experiment tested the hypothesis that a subpopulation of neural stem cells that migrated to the infarct region may represent a substrate for *de novo* blood vessel formation. Neural stem cells were obtained from neurospheres generated by cells isolated from the infarct region of 1 week post-MI rats, labelled with the non-diffusible fluorescent dye CM-DiI and injected in the non-infarcted left ventricle (NILV) of 3-day post-MI rats and sacrificed 7 days later. Within the infarct region,

numerous pockets of neurosphere-derived CM-DiI-labelled cells were identified. Nestin immunoreactivity was detected in CM-DiI-labelled cells that were morphologically analogous to undifferentiated neural stem cells identified in the myocardium and scar (Figure 7A). Furthermore,  $25 \pm 8$  CM-DiI-labelled vascular structures of varying calibre were identified in the infarct region of grafted post-MI hearts (Figure 8). The fluorescent tracker was observed in eNOS immunoreactive endothelial cells lining the interior of predominantly newly formed small calibre blood vessels (Figure 7B). Consistent with the concept of *de novo* blood vessel formation, CM-DiI staining was also detected in nestin immunoreactive endothelial cells (Figure 7C). By contrast, neither eNOS nor nestin staining was identified in the surrounding vasculature, albeit CM-DiI-labelled cells were present. These latter CM-DiI-labelled cells expressed desmin (Figure 7D) and smooth muscle  $\alpha$ -actin (data not shown), thereby supporting their differentiation to a vascular smooth muscle cell phenotype [18].

## DISCUSSION

Previous studies from our lab demonstrated that nestin-expressing cells characterized by a small cell body and numerous processes migrated to the infarct region from the viable myocardium following ischemic damage [1]. The present study has further demonstrated that these cells exhibited characteristics consistent with a neural stem cell phenotype as defined by the expression of musashi-1, ability to generate neurospheres and differentiation to a neuronal phenotype *in vitro*. Unexpectedly, the neural stem cell marker musashi-1 was not limited to nestin-expressing cells as immunoreactivity was also observed in rat cardiac myocytes. In neural stem cells, musashi-1 was implicated in maintaining their self renewal capacity, whereas the functional role of the transcriptional factor in terminally differentiated cardiac myocytes remains presently undefined [19]. Analogous to the infarcted rat heart, nestin-expressing cells were detected intercalated among cardiac myocytes and in the scar of post-MI patients. These cells had a small cell body with distinct processes that were morphologically analogous to the nestin-expressing population identified in the rat heart. Consistent with the latter data, the study by Scobioala et al. detected nestin mRNA in the normal human myocardium and further demonstrated an increased expression of the transcript in the infarcted heart [20]. Thus, the human myocardium contains nestin-immunoreactive cells intercalated among cardiac myocytes that may potentially represent a neural stem cell population. Furthermore, their concomitant appearance in the infarct region represents a conserved event associated with scar formation and healing across a wide range of species. Nestin staining was also observed in endothelial cells of small calibre vessels residing in the

scar of MI patients and a similar paradigm was reported in the infarcted rat heart [1]. A recent study has suggested that nestin expression in endothelial cells correlated with *de novo* blood vessel formation [21]. Lastly, in the viable myocardium bordering the peri-infarct region of the infarcted human heart, nestin immunoreactivity was detected in cells displaying a cardiac myocyte-like phenotype. An analogous observation was initially reported by our group in the ischemically damaged rat heart [1], and recently reaffirmed in the infarcted mouse heart [20]. Despite these data, the biological role of these nestin immunoreactive cardiac myocyte-like cells in reparative fibrosis remains unknown.

During development, cardiac neural crest stem cells participate in the septation of the cardiac outflow tract leading to the formation of the aorta and pulmonary artery [16,17]. Furthermore, in the adult heart, neural crest stem cells were detected in the semilunar and atrioventricular valves and the proximal cardiac conduction system [17]. In the myocardium of neonatal and adult mice, a neural crest-derived cardiac stem cell population was identified and characterized by the expression of nestin, musashi-1 and grew in culture as a sphere [2]. The latter data indirectly supported the premise that the neural stem cell population identified in the rat heart may likewise be of neural crest origin. In primary passage scar-derived cells isolated from the infarct region of 1-week post-MI rats and the left ventricle of normal rats, neural crest stem cell-associated genes *sox9*, *snail* and *slug* mRNAs were detected [4]. In addition, *sox9* immunoreactivity was observed in the nucleus of neural stem cells in both the neonatal and adult rat heart. Likewise, nestin immunoreactive cells with a small cell body and processes were detected in the neonatal and adult mouse heart

and stained positive for sox9 in the nucleus. Unexpectedly, nuclear sox9 staining was also observed in cardiac myocytes. To the best of our knowledge, this is the first study to identify sox9 in rat cardiac myocytes, albeit its biological role remains presently undefined. Consequently, to directly assess whether the cardiac neural stem cell population was of a neural crest origin, a compound transgenic mouse was used in which the neural crest lineage-specific promoter Wnt1 drives Cre recombinase expression to activate an EGFP reporter gene. This transgenic model was previously shown to successfully track the differentiation of early migratory neural crest stem cells to numerous tissues including the heart and skin [16,17,22]. In Wnt1-Cre transgenic neonatal mice, a cytoplasmic EGFP signal was detected in numerous nestin-expressing cells, thereby supporting their neural crest origin. In this regard, the neural stem cell population identified in the rat heart and nestin-expressing cells observed in the human heart may likewise be of neural crest origin. Unexpectedly, nestin<sup>(-)</sup>/EGFP<sup>(+)</sup> cells were also identified in the myocardium of these transgenic mice. Their ultimate fate remains presently unknown, albeit these Wnt-1 promoter driven nestin<sup>(-)</sup>/EGFP<sup>(+)</sup> cells may represent the subpopulation of dormant resident neural crest stem cells reported to differentiate to a cardiac myocyte [2].

In the ischemically damaged rat and dog heart, sympathetic fibre sprouting and innervation of the infarct region were observed during reparative fibrosis [1,8,10]. Regardless the ischemic insult, sympathetic fibre sprouting and subsequent innervation of the peri-infarct/infarct region of the rat heart was characterized by the physical association of nestin processes and neurofilament-M immunoreactive fibres. Furthermore, not all nestin immunoreactive processes innervating the peri-

infarct/infarct region were associated with sympathetic fibres during reparative fibrosis. Thus, it remains presently unknown whether only a restricted subpopulation of neural stem cells was implicated in sympathetic sprouting or the sprouting response itself was the limiting variable following ischemic injury. In addition, physically associated neurofilament-M fibres and nestin processes were detected in close proximity to small calibre blood vessels in the peri-infarct/infarct region. With regard to tissue healing, sympathetic fibre innervation of the ischemically damaged region may represent seminal event required for efficient scar formation and healing [5-7]. This effect may be related to postulated angiogenic action attributed to sympathetic fibres and their close proximity to small calibre vessels in the infarct region indirectly supports their potential role in *de novo* blood vessel formation [23,24].

A paradigm of axonal sprouting was previously established in the denervated skeletal muscle and required the involvement of Schwann cells. Specifically, following skeletal muscle denervation, terminal Schwann cells located at the motor endplate were reported to send out nestin immunoreactive extensions to neighbouring muscle cells that were closely associated with axonal sprouts growing from the nerve terminal [11,12]. Furthermore, nerve sprouts were only observed in association with Schwann cell extensions [11,12]. These findings were comparable to the paradigm of sympathetic sprouting reported following ischemic injury in the rat heart as nestin immunoreactive processes emanating from neural stem cells may likewise act as a scaffold and/or guidance mechanism. To further address this issue, we examined whether the anatomical paradigm of sympathetic fibre sprouting documented in the

ischemically damaged heart could be recapitulated after the acute administration of 6-hydroxydopamine. Two days following the completion of 6-hydroxydopamine treatment, sympathetic fibre degeneration was evident [25]. However, a paucity of intact neurofilament-M immunoreactive fibres were detected and physically associated with nestin immunoreactive processes. Thus, given the concomitant appearance of both sphere-forming nestin-expressing neural stem cells in the scar and the physical association of nestin processes with neurofilament-M fibres in the peri-infarct/infarct region, these observations support the hypothesis that a population of neural stem cells may behave like terminal Schwann cells by acting as a scaffold and/or guidance mechanism to promote sympathetic fibre sprouting. NGF and neuregulin-1 acting via the ErbB2 receptor were implicated in sympathetic sprouting in the ischemically damaged heart and axonal growth in the denervated skeletal muscle, respectively [10,11]. Thus, NGF and/or neuregulin-1 may act independently or in concert to promote sympathetic sprouting in the rat heart following 6-hydroxydopamine treatment. NGF mRNA levels were significantly increased in the myocardium of 6-hydroxydopamine treated rats whereas neuregulin-1 mRNA was unchanged as compared to untreated rats. Although the cellular source remains presently undefined, it is possible that the increased expression of NGF mRNA following 6-hydroxydopamine treatment may be attributed to neural stem cells, cardiac myocytes and/or fibroblasts. Lastly, although myocardial neuregulin-1 mRNA levels were not increased, the local synthesis by neural stem cells during sympathetic sprouting cannot be excluded. [11]



CNS- and neural crest-derived neural stem cells were reported to have endothelial and/or vascular smooth muscle differentiation capacity under the appropriate induction conditions [2,4,13-15,26]. The present study has confirmed that a subpopulation of nestin-expressing cells isolated from the infarct region exhibited characteristics consistent with a neural stem cell phenotype. To examine whether the reported plasticity of CNS and neural crest-derived stem cells was likewise inherent, neural stem cells were isolated from neurospheres generated from the infarct region of 1-week post-MI rats and injected in the viable myocardium of 3 day post-MI rats. One week following transplantation, pockets of CM-DiI-labelled cells were detected exclusively in the infarct region. A subpopulation of the CM-DiI-labelled cells residing in the scar was nestin immunoreactive and morphologically analogous to cardiac neural stem cells identified in the normal myocardium and infarct region. In addition, CM-DiI-labelled vascular structures were observed and the fluorescent tracker was detected in eNOS immunoreactive endothelial cells lining both small and large calibre vessels. Furthermore, nestin immunoreactivity in endothelial cells was reported to represent *de novo* blood vessel formation [1,21]. Consistent with this premise, CM-DiI and nestin staining were co-localized in endothelial cells of apparently newly formed small calibre vessels. Furthermore, injected CM-DiI-labelled cells were located in the surrounding vasculature and differentiated to a vascular smooth muscle phenotype as reflected by desmin staining. A similar finding was observed by Tomita and colleagues as the injection of a neural crest-derived cardiac population of stem cells in the mouse heart differentiated to vascular smooth muscle cell phenotype [2]. Thus, it is our opinion

that based on their apparent neural crest origin, similar phenotype and differentiation capacity *in vitro* and *in vivo*, the rat neural stem cell population identified in the present study and the mouse population of stem cells reported by Tomita and colleagues are related. In the context of scar formation and healing, a subpopulation of neural stem cells recruited from the viable myocardium to the infarct region may represent a novel substrate for *de novo* small calibre blood vessel formation during the early phase of reparative fibrosis.

### **Acknowledgements**

I would like to thank France Thériault for excellent secretarial assistance.

### **Funding Sources**

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". Dr. Fernandes is a recipient of a Canada Research Chair in Stem Cell Neurobiology. Viviane El-Helou is a Ph.D student funded by the Canadian Institutes of Health Research. Pauline Beguin is funded by the Bourse Lavoisier du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes.

## LEGENDS

### **Figure 1.** *Nestin-expressing cells in the heart*

(A) Nestin immunoreactive (red) processes and neurofilament-M (green) fibres in the left ventricle and (B) atria of a normal rat heart. (C) A nestin-expressing cell isolated from the atria. (D & F) In the left ventricle of a normal rat heart, nestin-expressing cells (indicated by arrow) and cardiac myocytes (indicated by asterisk) were associated with nuclear (E) musashi-1 and (G) sox9 immunoreactivity. In the left ventricle of either a (H) neonatal rat or (I) mouse heart, nuclear staining of sox9 was detected in nestin-expressing cells (indicated by arrow) and cardiac myocytes (indicated by asterisk). The nucleus was identified with the fluorescent marker to-pro<sup>3</sup> (blue).

### **Figure 2.** *Nestin-expressing cells exhibit a neural stem cell phenotype*

(A) A nestin-expressing cell detected in primary passage scar-derived cells and (B) neurofilament-M staining was absent. (C) A nestin immunoreactive neurosphere generated from primary passage scar-derived cells. (D) Phase contrast picture of panel C. (E) Induction of neurofilament-M and loss of (F) nestin immunoreactivity in cells derived from scar neurospheres following their plating in differentiation media. (G) Neurofilament-M induction in neurosphere-derived cells was associated with the co-expression of the neuronal marker (H)  $\beta$ III-tubulin.

**Figure 3.** *Nestin-expressing cells in the infarcted human heart*

(A) In the viable myocardium of a 1 week post-MI patient, nestin staining (red) was detected in cells with a small cell body and distinct processes (indicated by arrow) intercalated among connexin-43 (green) immunoreactive cardiac myocytes (indicated by asterisk). (B) In the infarct region of a 3 month post-MI patient, nestin immunoreactive cells were detected in the infarct region. (C) Nestin staining was identified in endothelial cells of small calibre vessels (indicated by asterisk) in the infarct region of a 3 month post-MI patient. (D) In the peri-infarct region of a 1 week post-MI patient, nestin staining was not limited to cells with a small cell body and processes (indicated by arrow) but was also observed in a paucity of cells exhibiting a cardiac myocyte-like phenotype (highlighted in box). The nucleus was labelled with the fluorescent marker to-pro<sup>3</sup> (blue).

**Figure 4.** *Neural crest origin of nestin-expressing cells*

In the heart of Wnt1-Cre transgenic neonatal mice, EGFP immunoreactivity was detected in nestin-expressing cells (indicated by arrow and highlighted in the box). Furthermore, EGFP (green) immunoreactive cells lacking nestin staining were also detected in the myocardium (indicated by asterisk). The nucleus was labelled with the fluorescent marker to-pro<sup>3</sup> (blue).

**Figure 5.** *The physical interaction of nestin processes and neurofilament-M fibres*

Following either (A) complete coronary artery ligation or (B) ischemia/reperfusion injury in the rat heart, neurofilament-M (green) fibres innervating the peri-infarct/infarct region were physically associated (indicated by arrow) with nestin

immunoreactive (red) processes. A paucity of these fibres were observed in close proximity to a blood vessel (indicated by asterisk) highlighted by nestin staining of endothelial cells. (C) Intact neurofilament-M fibres in the normal rat heart were not associated with nestin processes. (D) In the heart of 6-hydroxydopamine treated rats, sympathetic fibre degeneration was evident as reflected by the degraded pattern of neurofilament-M staining. (E) However, a paucity of intact neurofilament-M (green) fibres was detected in the heart of 6-hydroxydopamine treated rats and physically associated with nestin immunoreactive (red) processes (indicated by arrow and highlighted in box). (F) The image highlighted in the box of Panel E was magnified and reveals the physical association of neurofilament-M fibres and nestin processes.

**Figure 6.** *Sympathetic fibre density and growth factor expression in the heart of 6-hydroxydopamine treated rats*

(A) Neurofilament-M fibre density was significantly reduced in the heart of 6-hydroxydopamine (DOPA)-treated rats (n=3). (B) Nerve growth factor mRNA expression was significantly increased in the heart of 6-hydroxydopamine treated rats (n=7) compared to untreated rats (n=7). By contrast, neuregulin-1 mRNA expression in the heart of 6-hydroxydopamine treated rats (n=6) was similar to untreated rats. \* denotes  $P < 0.05$  versus untreated rats.

**Figure 7.** *In vivo injection of cells isolated from neurospheres generated from primary passage scar-derived cells*

(A) Numerous CM-DiI-labelled cells (A1;red) detected in the infarct region were nestin immunoreactive (A2;green). These cells (A3) were characterized by a small

cell body and processes (indicated by arrow). **(B)** In a pocket of grafted CM-DiI labelled cells, vascular structures were detected. CM-DiI fluorescence (**B1**;red) and eNOS (**B2**; green) immunoreactivity were observed within the endothelial layer of small calibre vessels (**B3**) (highlighted in box). **(C)** CM-DiI fluorescence (**C1**;red) and nestin (**C2**;green) immunoreactivity were also detected in the endothelial layer of small calibre vessels (C3) (highlighted in box). Furthermore, CM-DiI and nestin staining were identified in individual cells (indicated by arrow). **(D)** Differentiation to a vascular smooth muscle was observed as CM-DiI fluorescence (**D1**;red) and desmin (**D2**;green) staining were detected in the outer layer of numerous small calibre vessels (**D3**) (highlighted in box). Furthermore, CM-DiI and desmin staining were identified in individual cells (indicated by arrow).

**Figure 8.** *Vessel number and lumen area of de novo blood vessels*

Following the injection of CM-DiI-labelled scar-derived neural stem cells, *de novo* small calibre blood vessels (V) were predominantly detected and associated with an average surface area of  $49 \pm 4 \mu\text{m}^2$ . Furthermore, a modest number of CM-DiI-labelled large calibre blood vessels (surface area;  $143 \pm 15$  and  $397 \pm 55 \mu\text{m}^2$ ) were also identified.

## REFERENCES

- [1] El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, et al. Resident nestin<sup>(+)</sup> neural stem cells and fibres were detected in the normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* 2005;46:1219-25.
- [2] Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, et al. Cardiac neural stem cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 2005;170:1135-46.
- [3] Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biol* 2005;3:778-84.
- [4] Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, et al. A dermal niche for skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biol* 2004;6:1082-93.
- [5] Carr RW, Delaney CA, Westerman RA, Roberts RG. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* 1993;4:467-70.
- [6] Kishimoto S, Maruo M, Ohse C, Yasuno H, Kimura H, Nagai T, et al. The regeneration of the sympathetic catecholaminergic nerve fibers in the process of burn wound healing in guinea pigs. *J Invest Dermatol* 1982;79:141-6.

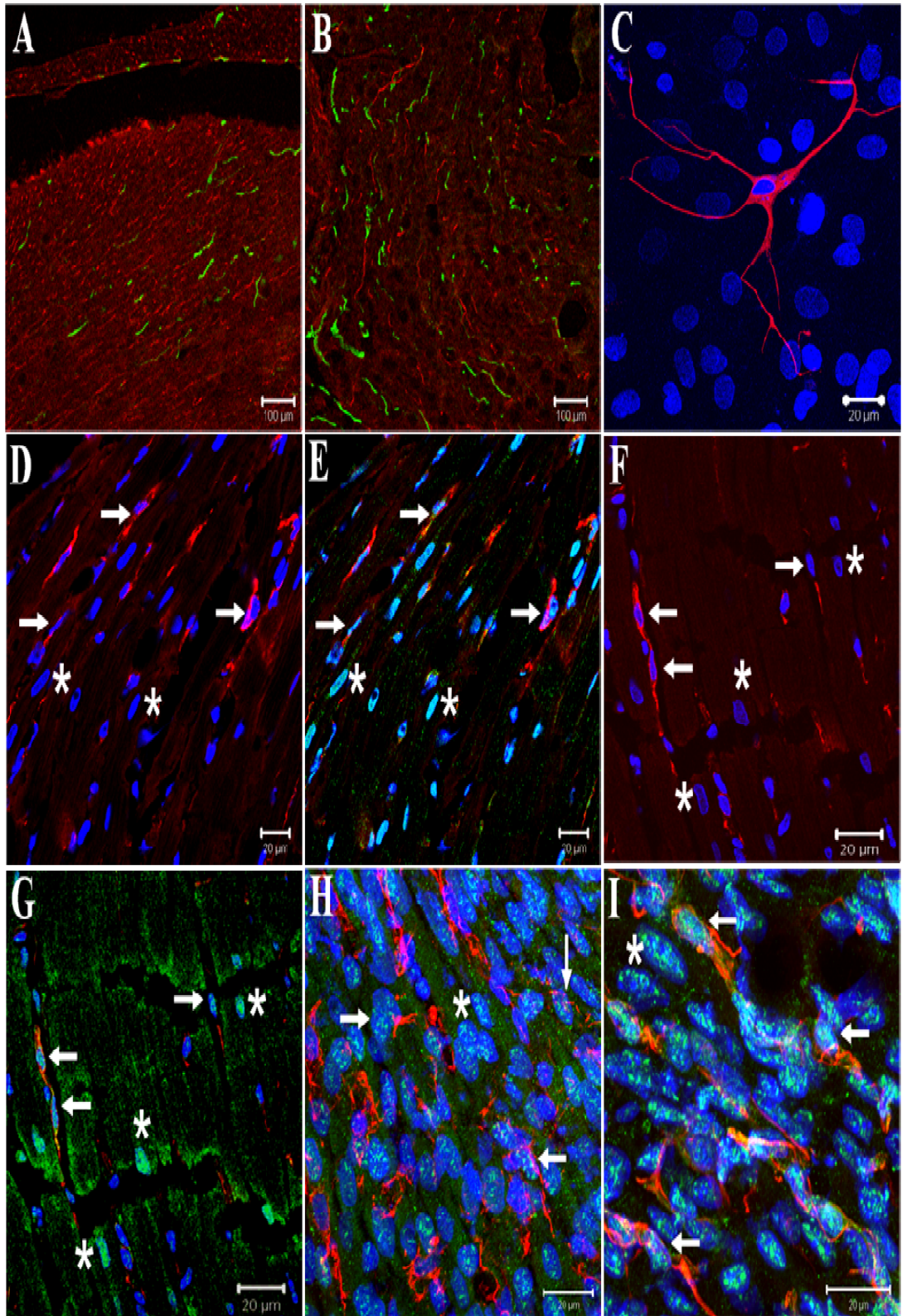
- [7] Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 1998;3:194-201.
- [8] Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Fate of nerve fibers in necrotic, healing and healed rat myocardium. *Lab Invest* 1990;63:490-501.
- [9] Zhang LQ, Laato M. Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol* 2001;90:29-32.
- [10] Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, et al. Mechanisms of cardiac nerve fiber sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res* 2004;95:76-83.
- [11] Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M, Thompson WJ. Induction of neuregulin in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 2006;26:6873-84.
- [12] Kang H, Tian L, Son YJ, Zuo Y, Procaccino D, Love F, et al. Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 2007;27:5948-57.
- [13] Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, et al. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13291-5.



- [14] Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004;430:350-6.
- [15] Oishi K, Ogawa Y, Gamon S, Uchida MK. Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. *J Physiol* 2002;540:139-52.
- [16] Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of mammalian cardiac neural crest. *Development* 2000;127:1607-16.
- [17] Nakamura T, Colbert MC, Robbins J. Neural crest cells retain multipotential characteristics in developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ Res* 2006;98:1547-54.
- [18] Speer MY, Chien YC, Quan M, Yang HY, Vali H, McKee MD, et al. Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro. *Cardiovasc Res* 2005;66:324-33.
- [19] Okano H, Kawahara H, Toriya M, Nakao K, Shibata S, Imai T. Function of RNA-binding protein musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res* 2005;306:349-56.
- [20] Scobioala S, Klocke R, Kuhlmann M, Tian W, Hasib L, Milting H, et al. Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *Faseb J* 2008;22:1021-1031
- [21] Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, et al. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 2004;13:658-64.

- [22] Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 2006;175:1005-15.
- [23] Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito, M. Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J* 1997;328:179-83.
- [24] Carmeliet P. Blood vessels and nerves: common signal pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 2003;4:710-20.
- [25] Mircoli L, Fedele L, Benetti M, Bolla GB, Radaelli A, Perlini S, et al. Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. *Circulation* 2002;106:866-72.
- [26] Mann KM, Ray JL, Moon ES, Sass KM, Benson MR. Calcineurin initiates smooth muscle cell differentiation in neural crest stem cells. *J Cell Biol* 2004;165:483-91.

Figure 1



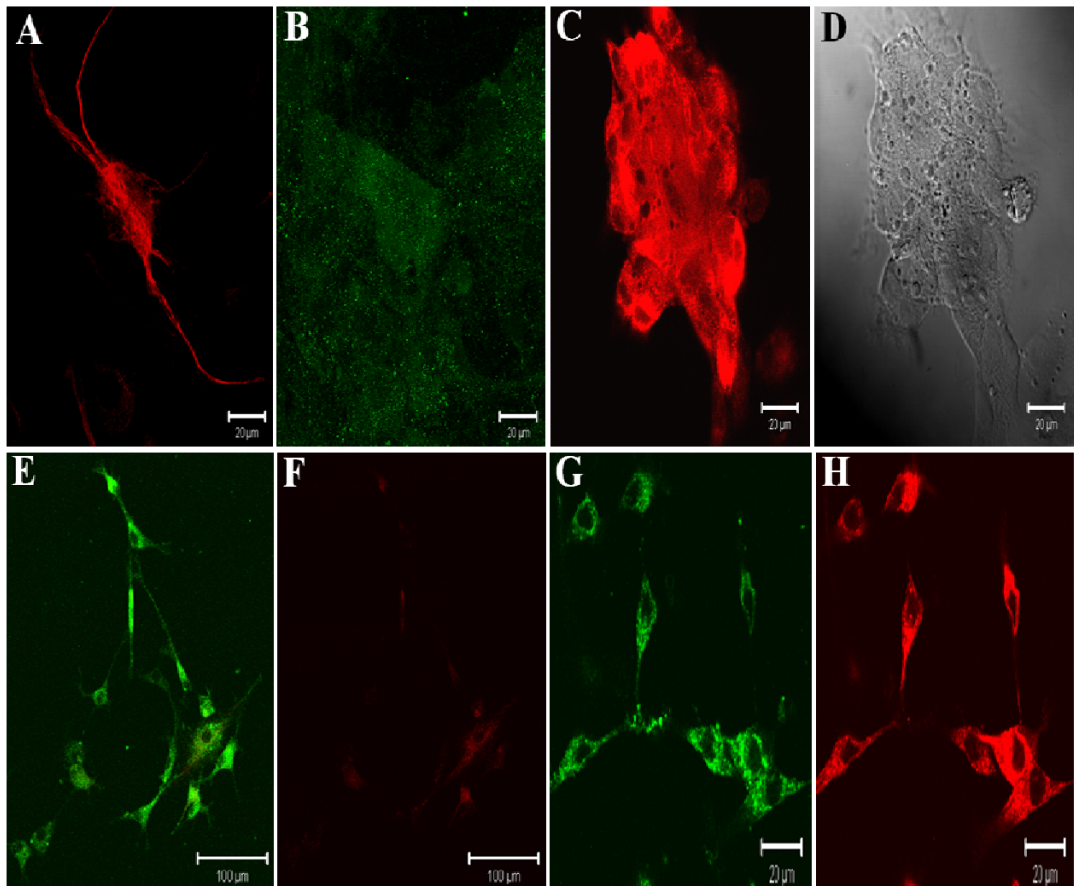
**Figure 2**

Figure 3

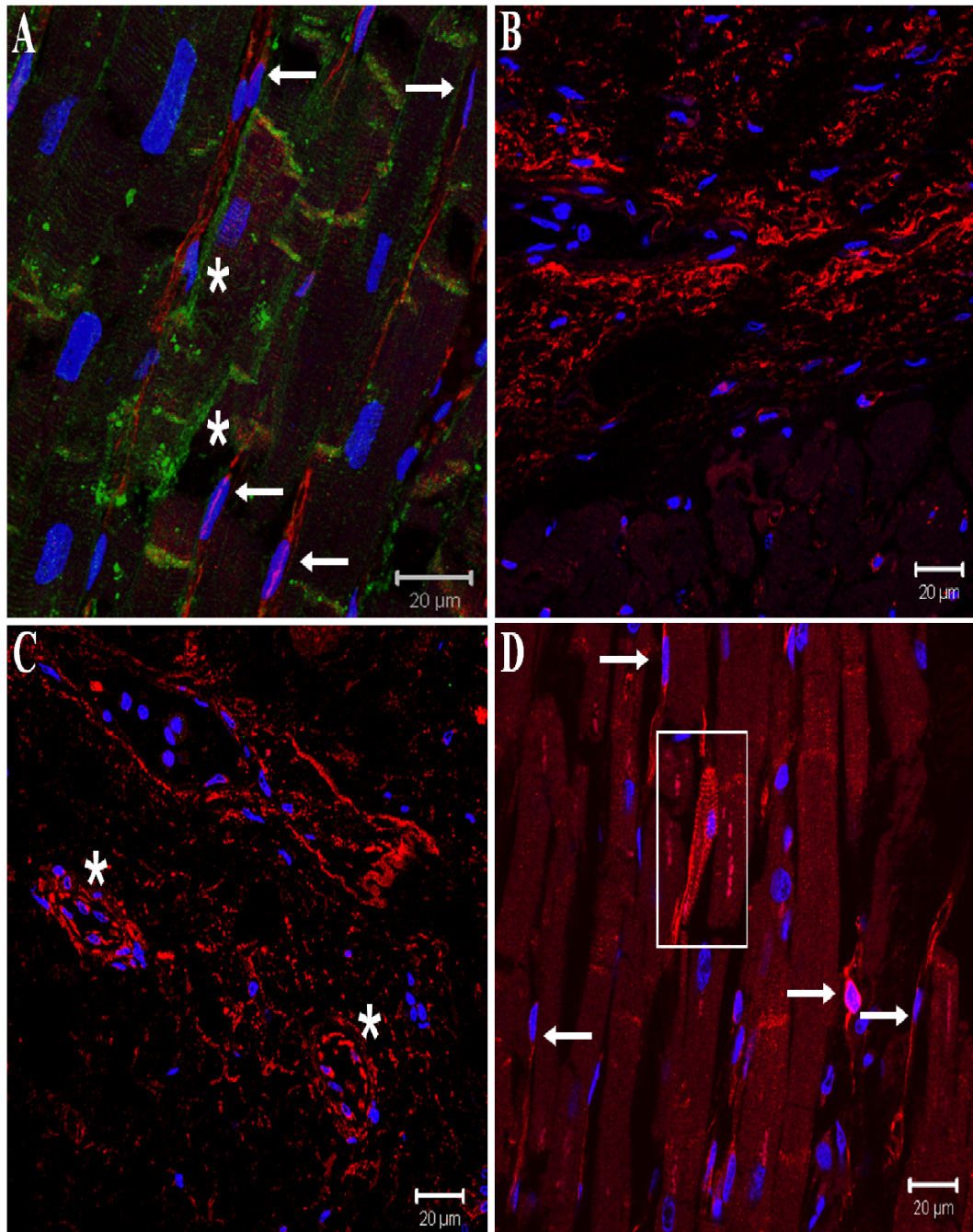


Figure 4

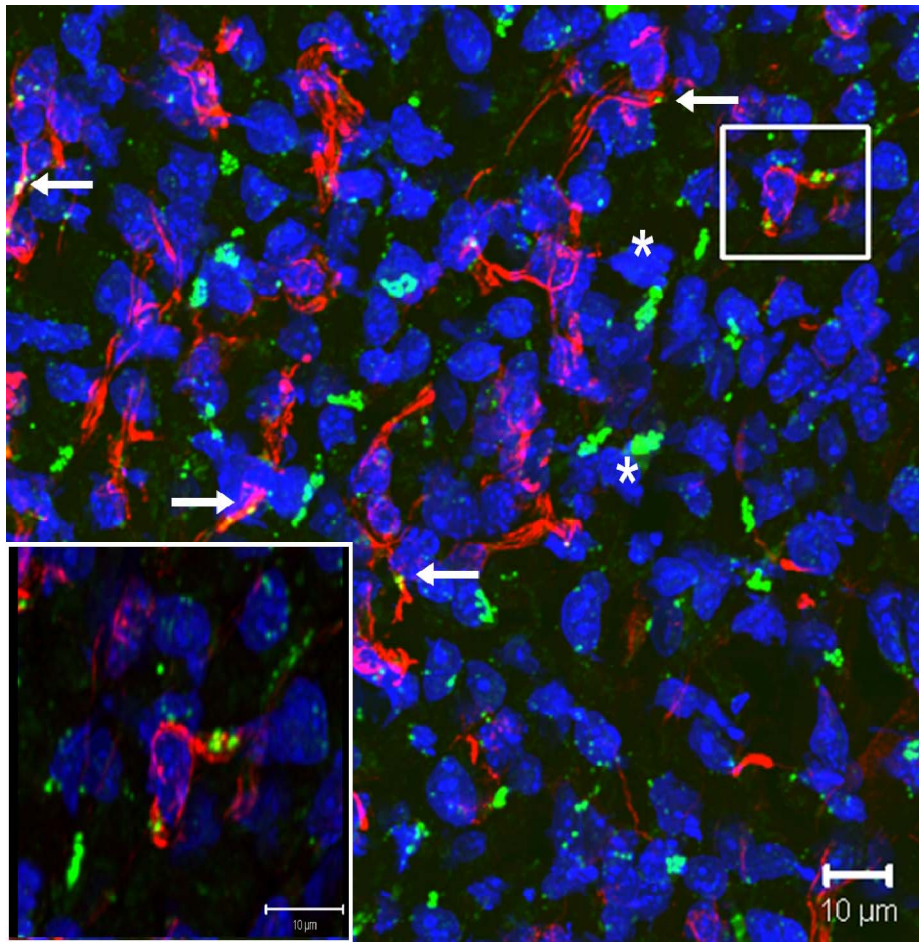


Figure 5

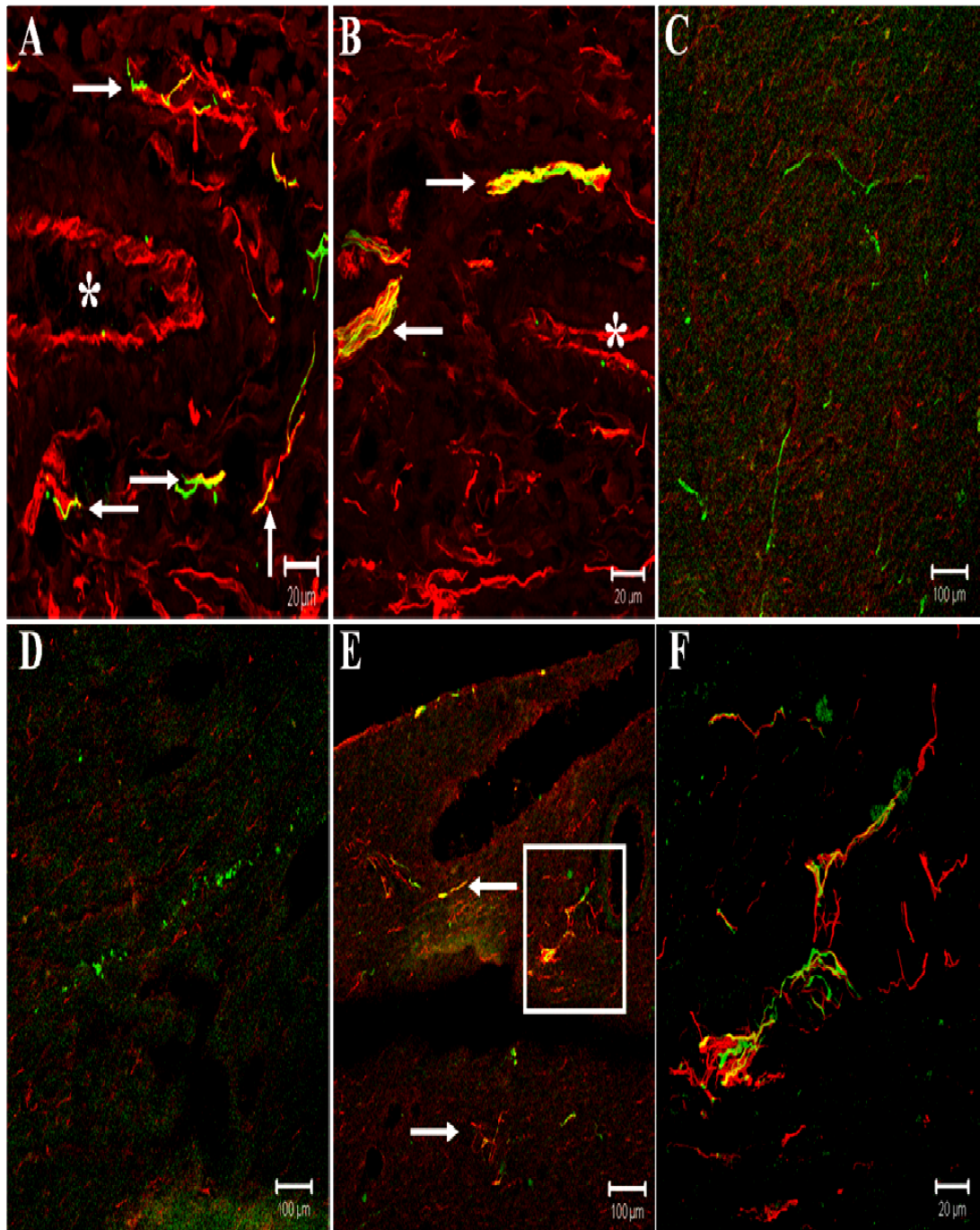


Figure 6

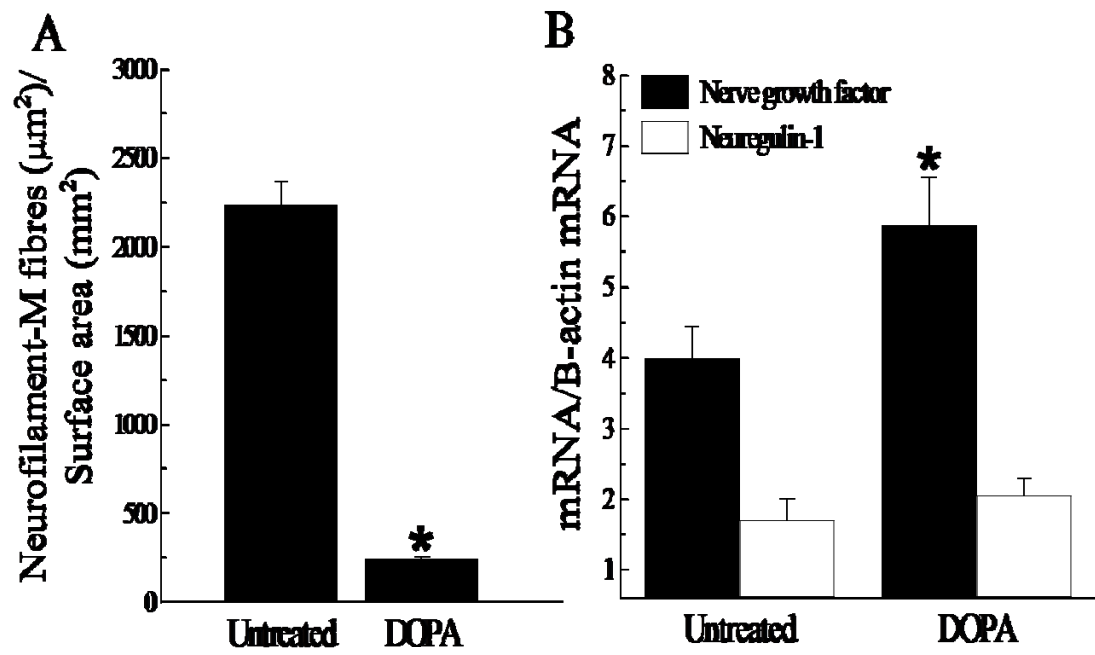




Figure 7A

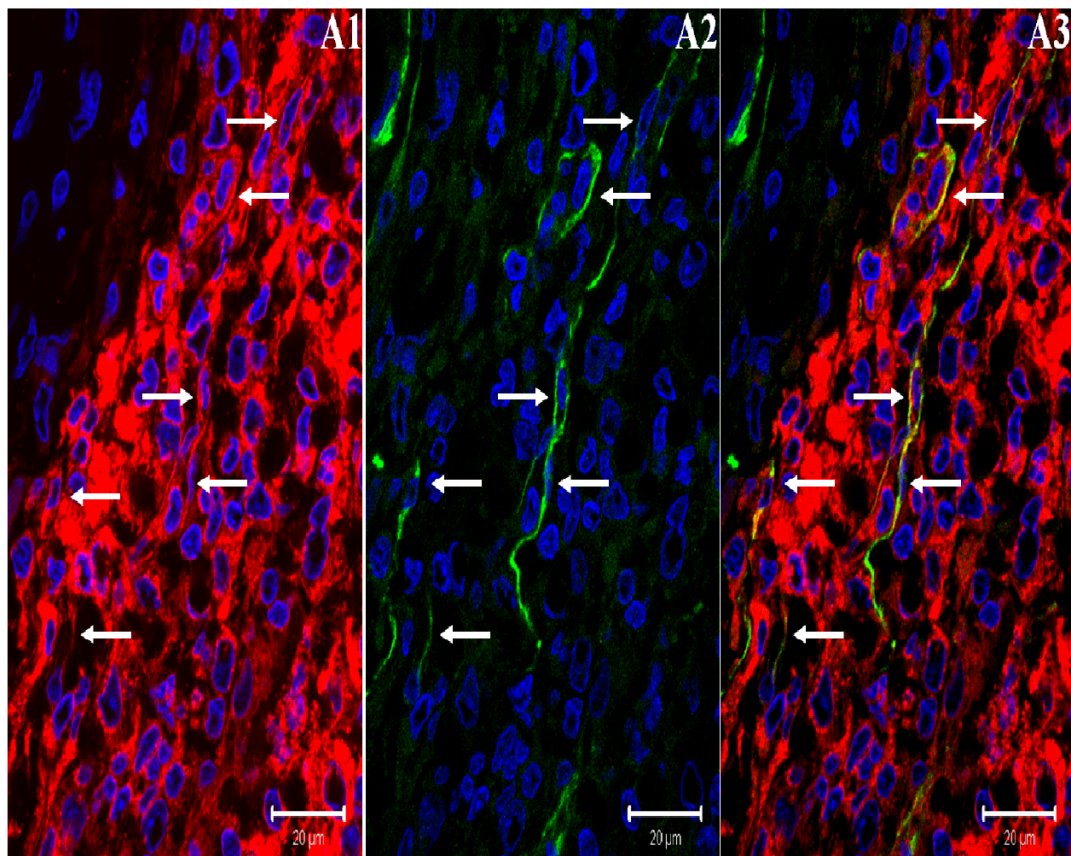


Figure 7B

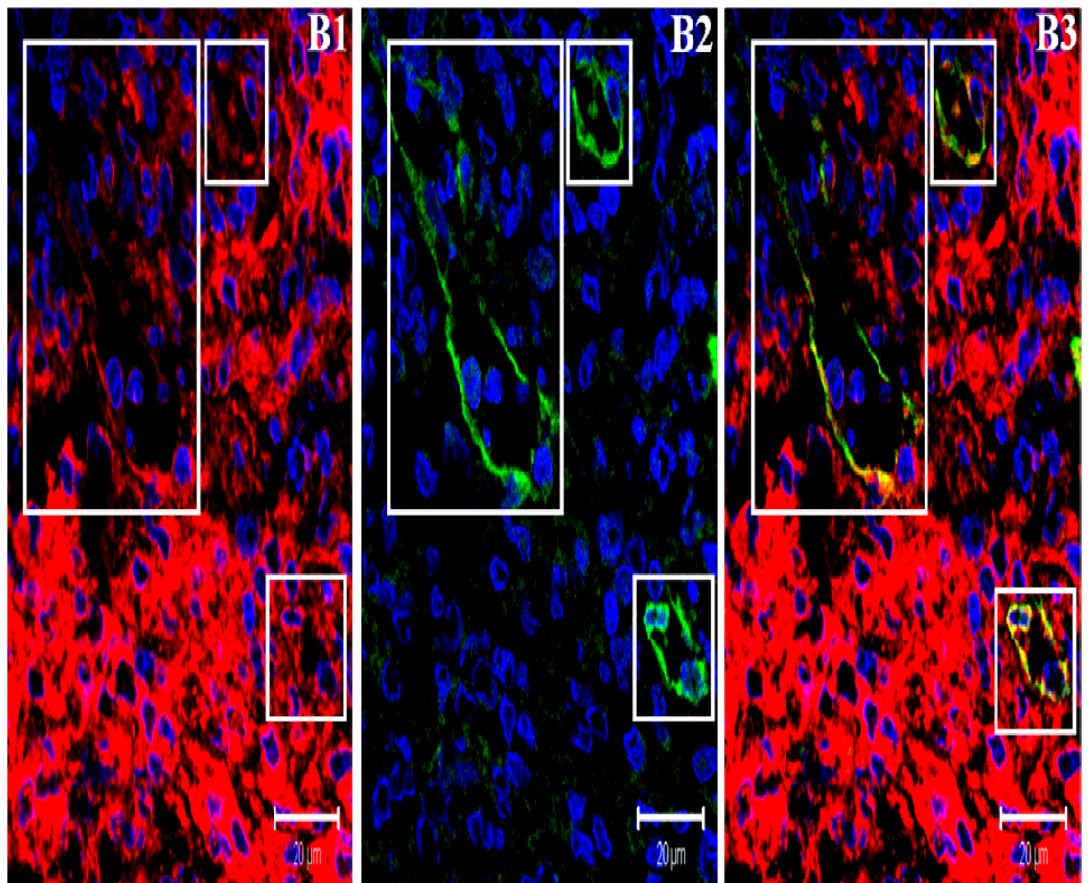


Figure 7C

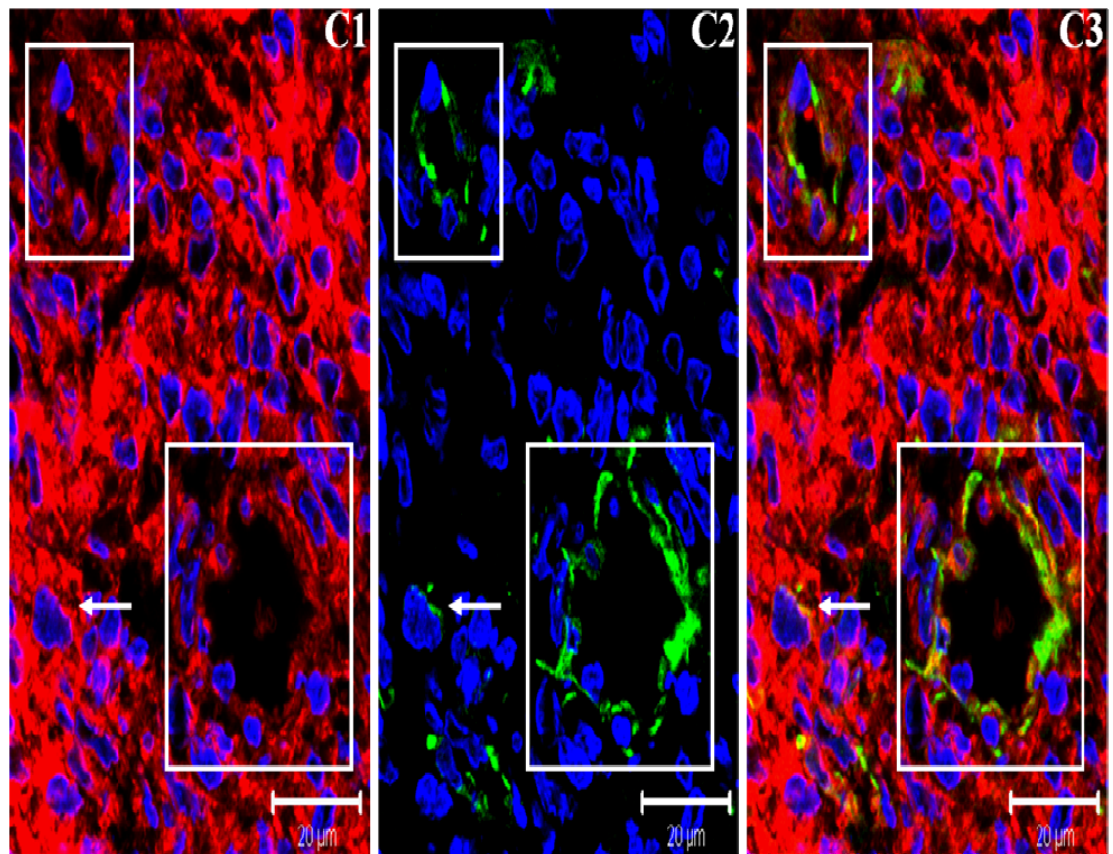


Figure 7D

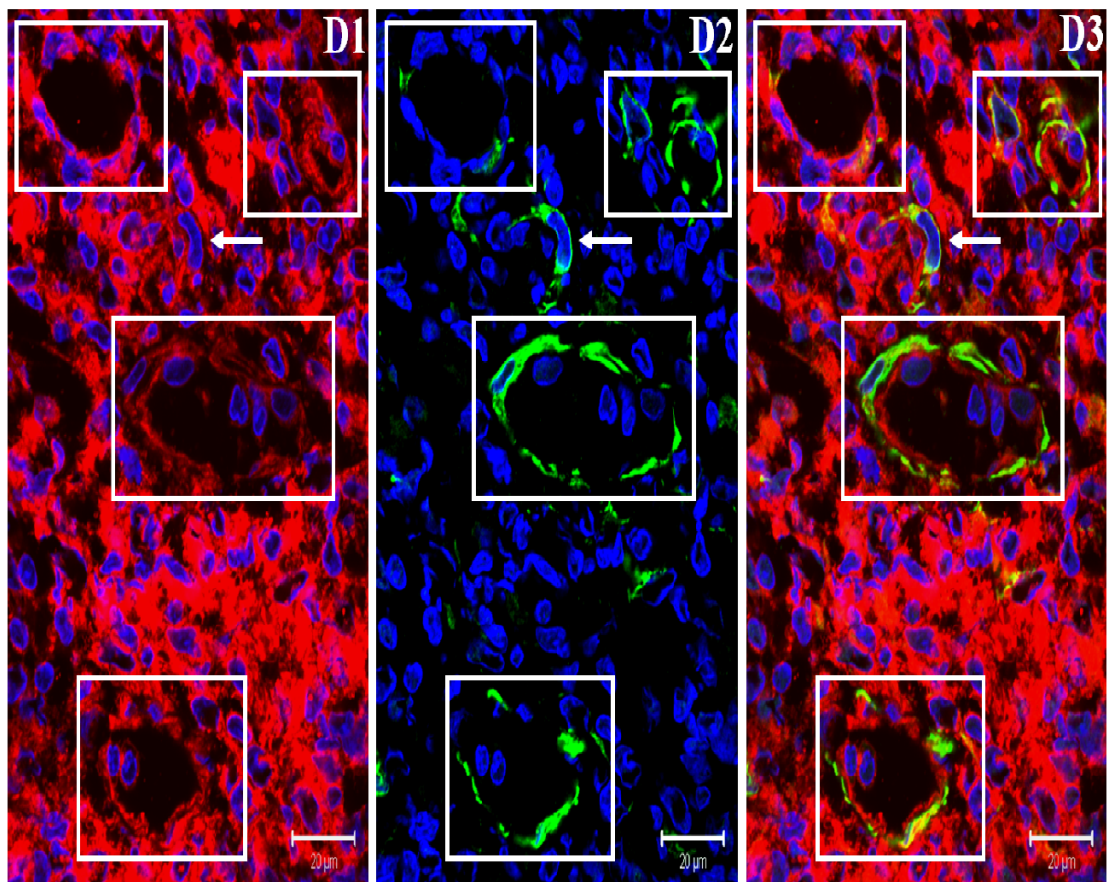
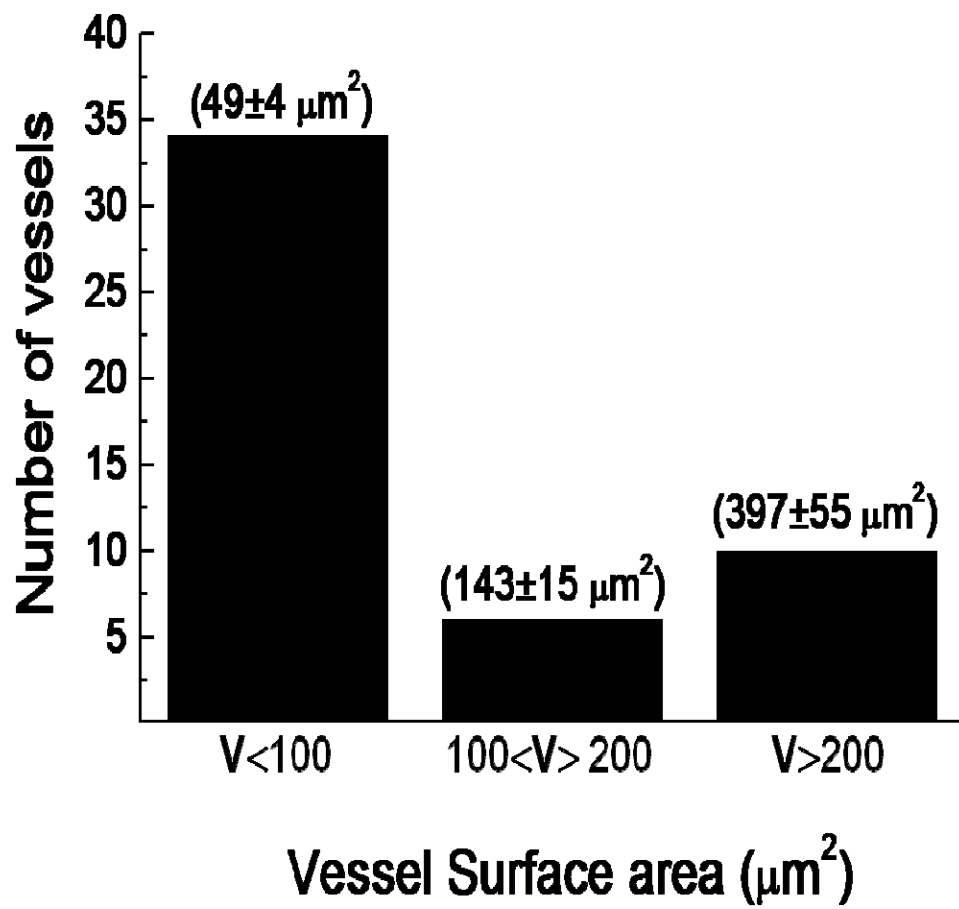


Figure 8



**Table 1 Real-time PCR primers derived from the rat**

	Forward	Reverse
nestin	5'-TGCAGGCCACTGATAAGTTCCA-3'	5'-TTCTCCTGCTCCAGGGCTTCCA-3'
sox9	5'-AGGAAGCTGGCAGACCAGTACC-3'	5'-TCTCTTCTCGCTCTCGTTCA-3'
slug	5'-ATGTGAGCCTGGGTGCCCTGAAGA-3'	5'-TGCCCTCAGGTTTGATCTGT-3'
snail	5'-GCCGGAAGCCCAACTATAGC-3'	5'-GTAGGGCTGCTGGAAGGTGAAC-3'
pax3	5'-AGAGGAAGCAGCGCAGGAGTA-3'	5'-CCCCCGGAATGAGATGGTTGAA-3'
$\beta$ - actin	5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3'	5'-GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'

**Chapitre 4 LE TRAITEMENT AVEC LE  
GLUCOCORTICOIDE DEXAMETHASONE  
ATTÉNUÉ L'INNERVATION SYMPATHIQUE DE  
LA CICATRICE**

Suite à un infarctus du myocarde, la mort tissulaire engendre une réaction inflammatoire qui déclenche le processus de cicatrisation. Ainsi, le myocarde infarci est remplacé par un tissu fibreux menant à la formation d'une cicatrice permanente. Cette fibrose, connue sous le nom de fibrose de réparation, est un processus adaptatif et essentiel assurant l'intégrité du ventricule et plusieurs événements cellulaires y sont associés. La cicatrice est composée de myofibroblastes et de cellules vasculaires (Sun Y et Weber KT, 1996a; Sun Y et Weber KT, 2000; Frangogiannis NG et al., 2002). Récemment, deux composantes cellulaires additionnelles ont été identifiées dans la région infarctée soient les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques ainsi que l'innervation par des fibres sympathiques NF-M positives (Vracko R et al., 1990; Drapeau J et al., 2005).

Une perturbation au niveau des myofibroblastes et de la réponse angiogénique est associée à une formation mal adaptative de la cicatrice cardiaque. Une diminution de la prolifération des myofibroblastes et/ou de la sécrétion de collagène par ces derniers ainsi qu'une atténuation de l'angiogénèse conduisent à un amincissement de la cicatrice (Sholter DE et Armstrong PW, 2000; Fazel S et al., 2006; Cimini M et al., 2007; Barandon L al., 2003; Wang Y et al., 2004; Lindsey ML et al., 2002). Dans l'étude précédente, nous démontrons que les cellules souches neuronales nestine positives sont impliquées dans la réinnervation sympathique de la cicatrice cardiaque. Par contre, le rôle de cette innervation sympathique dans le remodelage cicatriciel demeure méconnu. Au niveau cutané, l'innervation sympathique est nécessaire pour une réparation tissulaire adéquate car elle régule la prolifération des myofibroblastes, l'angiogénèse ainsi que l'inflammation (Kim LR et al., 1998; Altun



V et al., 2001; Kishimoto S et al., 1982). Ces données suggèrent alors que l'innervation sympathique pourrait aussi participer au remodelage cicatriciel cardiaque. Dans l'étude suivante, nous examinons la contribution de l'innervation sympathique dans la formation de la cicatrice cardiaque en utilisant un modèle où la cicatrisation est mal adaptative. Il est connu que la perturbation du processus inflammatoire peut avoir un effet délétère sur la fibrose de réparation (Sholter DE et Armstrong PW, 2000). Ainsi, des rats ayant subi un infarctus du myocarde ont été traités avec le corticostéroïde DEX, ce qui engendre une diminution de la taille et de l'épaisseur de la cicatrice. L'hypothèse avancée est que le traitement avec DEX influence négativement la fibrose de réparation en diminuant la prolifération des myofibroblastes et la réinnervation sympathique de la région infarctée.

# **Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region**

Viviane El-Helou<sup>1,2</sup>, Cindy Proulx<sup>1,2</sup>, Hugues Gosselin<sup>2</sup>, Robert Clement<sup>2</sup>, Andrea Mimeo<sup>2</sup>, Louis Villeneuve<sup>2</sup> & Angelino Calderone<sup>1,2,3</sup>

**J Appl Physiol 104: 150–156, 2008**

<sup>1</sup> Département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

**Running Head:** Dexamethasone and neural remodelling

## ABSTRACT

Sympathetic fibre innervation of the damaged region following injury represents a conserved event of wound healing. The present study tested the hypothesis that impaired scar healing in post-myocardial infarction (post-MI) rats was associated with a reduction of sympathetic fibres innervating the infarct region. In 1-week post-MI rats, neurofilament-M immunoreactive fibres ( $1116 \pm 250 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ) were detected innervating the infarct region and observed in close proximity to a modest number of endothelial nitric oxide (eNOS) synthase -immunoreactive scar-residing vessels. Dexamethasone (DEX) treatment (6 days) of post-MI rats led to a significant reduction of scar weight (dexamethasone+MI,  $38 \pm 4$  versus MI,  $63 \pm 2$  mg) and a disproportionate non-significant decrease of scar surface area (dexamethasone+MI,  $0.54 \pm 0.06$  versus MI,  $0.68 \pm 0.06 \text{ cm}^2$ ). In dexamethasone-treated post-MI rats, the density of neurofilament-M immunoreactive fibres ( $125 \pm 47 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ) innervating the infarct region was significantly reduced and associated with a decreased expression of nerve growth factor (NGF) mRNA (dexamethasone+MI,  $0.80 \pm 0.07$  versus MI,  $1.11 \pm 0.08$ ;  $p < 0.05$  versus MI). Previous studies have demonstrated that scar myofibroblasts synthesize NGF and may represent a cellular target of dexamethasone. The exposure of 1<sup>st</sup> passage scar myofibroblasts to dexamethasone led to a dose-dependent suppression of <sup>3</sup>H-thymidine uptake and a concomitant attenuation of NGF mRNA expression (untreated,  $3.47 \pm 0.35$  versus DEX-treated,  $2.28 \pm 0.40$ ;  $p < 0.05$  versus untreated). Thus, the present study has demonstrated that impaired scar healing in dexamethasone-treated post-MI rats was associated with a reduction of neurofilament-M immunoreactive fibres innervating the infarct region.

The attenuation of scar myofibroblast proliferation and NGF mRNA expression may represent underlying mechanisms contributing to the diminished neural response in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats.

**Key words:** dexamethasone, neural remodelling, myocardial infarction, myofibroblasts, NGF

## INTRODUCTION

Following damage to either the heart or skin, the enhanced synthesis and secretion of extracellular matrix proteins by smooth muscle  $\alpha$ -actin expressing myofibroblasts play a fundamental role in scar formation and healing (14, 20, 27). Recently, both sensory and sympathetic innervation were identified as integral events implicated in cutaneous wound healing and sympathetic fibre innervation was likewise reported in the damaged region of both the dog and rat heart following an ischemic insult (4, 9, 10, 12, 17, 20, 28, 31). During cutaneous wound healing, myofibroblast-derived synthesis and release of the neurotrophin nerve growth factor (NGF) was postulated as the underlying mechanism propagating sensory and sympathetic innervation (14, 31). In the infarct region of post-MI dogs, NGF protein and mRNA levels were significantly increased 3 days following surgery and remained elevated for at least 1 month after MI (31). Unfortunately, the cellular source of NGF in the infarcted dog heart was not identified. However, consistent with the paradigm described during cutaneous wound healing, NGF expression was detected in myofibroblasts isolated from the infarct region of 1-week post-MI rats (9). Collectively, these data suggest that fibre innervation represents an obligatory feature of wound healing across a range of tissue types facilitated in part via the local synthesis and release of NGF by infiltrating myofibroblasts.

It has been well established that corticosteroid therapy during the acute phase following coronary artery ligation leads to impaired scar formation (2, 26). In some cases, scar rupture was reported in post-MI patients receiving corticosteroids (26). An underlying mechanism attributed to the action of corticosteroids was inhibition of

the inflammatory response during the early phase of scar formation (2, 13, 26). It remains presently unknown whether additional integral events implicated in scar formation and healing are likewise targeted by corticosteroids. Thus, the presented study tested the hypothesis that impaired scar healing in dexamethasone-treated post-MI rats was associated with a concomitant reduction of sympathetic fibres innervating the infarct region and attributed at least in part to the inhibition of scar myofibroblast growth and NGF expression.

## **METHODS**

### **Myocardial infarct model, hemodynamics and isolation of scar-derived cells.**

Myocardial infarction was induced in male Sprague-Dawley rats (9-11 weeks old; Charles Rivers, Canada) following ligation of the left anterior descending coronary artery as previously described (9). Dexamethasone (0.1 mg/kg) was added to normal rat chow 24 hrs post-MI and continued for 6 days. During the 1 week protocol, the dosage was adjusted according to changes in body weight. Left ventricular contractility was examined at 1 week post infarction by a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2F, Millar instrument, Houston, Texas, U.S.A.), as previously described (9). Data was analyzed with the program IOX version 1.8.9 (Emka Technologies; Falls Church, VA). In both MI and dexamethasone-treated MI groups, we were unable to acquire hemodynamic data from 3 rats. Following hemodynamic measurements, the heart was removed and separated into the right ventricle, left ventricle (LV; or non-infarcted left ventricular free wall; NILV),

septum, and scar. The left ventricular free wall and right ventricle were immediately weighed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In MI rats, infarct region was excised, weighed, and the surface area was calculated by planimetry, as previously described [21]. 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. Scar myofibroblasts were isolated from the infarct region of 1-week post-MI rats and the in vitro experiments described in the present study were performed on 1<sup>st</sup> passage cells, as previously described (6).

**Real Time PCR.** Real time PCR was performed by standard methodology on total RNA isolated from the left ventricle of normal rats, the non-infarcted left ventricle of 1-week post-MI rats and 1<sup>st</sup> passage scar myofibroblasts, as previously described (10). Real time PCR was performed according to the manufacturer's instructions employing the molecule 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](http://www.ensembl.org)). The sequence specificity of each primer was verified with the program Blast derived from the National Centre for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The primers used were the following rat ANP; forward 5'-AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3' and reverse 5'ATTTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'; rat collagen  $\alpha_1$  Type 3 forward 5'-GGACCTGGTTTCTTCTCACCC-3' and reverse 5'-AGGTAGTTGCATCCCAATTCA-3'; rat nerve growth factor-beta forward 5'-CAGCTTTCTATCCTGGCCACTC-3' and reverse 5'-GAGTCTCCCTCTGGGACATTG-3' and rat  $\beta$ -actin forward 5'-

CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3' and reverse 5'-  
GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'.

**Immunofluorescence staining of tissue.** In a separate series of experiments, the heart from MI (n=3) and dexamethasone-treated MI (n=3) rats was excised, immersed directly in 2-methyl butane (temperature maintained at -80°C), and stored at -80°C. Immunofluorescence on cardiac tissue (cryostat sections of 14 µm thickness) was performed as previously described (10). In both groups, cardiac weight, infarct size and hemodynamics were not assessed. Sympathetic fibres were identified in the infarct region via neurofilament-M immunoreactivity (rabbit polyclonal 1:500, Chemicon) and endothelial cells were detected by endothelial NOS staining (mouse monoclonal anti-eNOS 1:100, BD Transduction Laboratories). The nucleus was identified with ToPro3 (1.5 µM; emission wavelength, 661 nm) staining following RNAase digestion. Secondary antibodies used were a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 (1:500; InVitrogen; emission wavelength, 520 nm) and a goat anti-mouse conjugated to Alexa-546 (1:500; InVitrogen; emission wavelength, 570 nm). A fluorescence signal was not detected when the tissue was incubated with conjugated secondary antibody alone. Immunofluorescence was visualized with either a 10X- or 63X-oil 1.4 NA DIC plan apochromat objective mounted on a Zeiss Axiovert 100M confocal microscope in a field of 0.7-0.84 mm<sup>2</sup>. To determine sympathetic fibre density, two transverse sections from the heart of each MI and dexamethasone-treated MI rat were used and neurofilament-M immunoreactive fibres were examined throughout the entire infarct region. The program LSM 5 Image Browser (Zeiss) was used to calculate sympathetic fibre density (µm<sup>2</sup>) and



was subsequently normalized to the scar surface area ( $\text{mm}^2$ ; consisting of 8-10 fields and each field represents an area of 0.7-0.84  $\text{mm}^2$ ). Figure 2 consists of projections (LSM 510 software; Zeiss) derived from a z-stack (voxel size of 143x143x250 nm in XYZ) of a 14  $\mu\text{m}$  thick cryosection. The Z-stack image was subsequently deconvolved (Huygens Professional 3.0; SVI, Netherlands) and the final image reconstructed with the LSM 510 software.

**DNA Synthesis.** First passage scar myofibroblasts were treated with dexamethasone for 24 hours and DNA synthesis was assessed by the addition of 1  $\mu\text{Ci/ml}$  of  $^3\text{H}$ -thymidine (ICN Biomedicals Inc., California, USA) for 4-6 hours prior to the end of the treatment protocol. Cells were washed twice with PBS ( $4^\circ\text{C}$ ) and cold 5% trichloroacetic acid was added for 1hr to precipitate DNA. The precipitates were washed twice with cold water and re-suspended in 0.4 M NaOH. Aliquots were counted in a scintillation counter.

**Western blot.** Scar tissue was lysed in a buffer containing 10 mM TRIS (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% triton X-100, 0.5% nonidet P-40, and 1  $\mu\text{g/ml}$  of leupeptin and aprotinin. The homogenate was centrifuged for 10 min, the supernatant frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The BioRad assay was used to determine protein content. The lysate (100  $\mu\text{g}$ ) was subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis, and protein was subsequently transferred to a PVDF membrane (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). Immunoblotting was performed as previously described (9). Antibodies used were a mouse monoclonal anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin (1:500; Sigma); a rabbit polyclonal

anti-growth associated protein 43 (GAP43, 1:1000; Chemicon); and a mouse monoclonal anti-GAPDH (1:10,000; Ambion). The secondary antibody used was a goat anti-mouse conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000 Santa Cruz Biotechnology, California, USA). The immunoreactive protein signal was visualized by an ECL detection kit (Perkin Elmer). Films were scanned with a laser densitometer utilizing the program Quantity One (BioRad Laboratories, Canada). Smooth muscle  $\alpha$ -actin and GAP43 protein expression were normalized to GAPDH protein content.

### **Statistics**

Data were presented as the mean $\pm$ S.E.M, and (n) represents either the number of rats used per experiment or independent preparations of cells. Morphological and hemodynamic data and gene expression were evaluated by a two-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman-Keuls post-hoc test. Scar weight, surface area, neurofilament-M fibre density, protein content and NGF mRNA expression in the infarct region were evaluated with a Students' unpaired t-test. In 1<sup>st</sup> passage scar myofibroblasts, NGF mRNA expression was evaluated with a Students' paired t-test as untreated and dexamethasone-treated cells were matched from the same preparation and repeated in 3 separate experiments. A value of  $P<0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### **Cardiac morphology and left ventricular function in 1-week post-MI rats and the effect of dexamethasone**

Ligation of the anterior descending coronary artery resulted in the loss of cardiac tissue leading to scar formation (Table 1). Absolute left ventricular weight and LV/BW ratio were reduced in 1-week post-MI rats (Table 1). Left ventricular systolic pressure, the rate of contraction and relaxation were decreased, whereas left ventricular end-diastolic pressure was modestly increased in 1-week post-MI rats, as compared to sham rats (Table 2). In dexamethasone-treated sham and MI rats, a significant reduction of body weight was observed, as compared to non-treated rats. In dexamethasone-treated post-MI rats, a non-significant reduction (21%) of scar surface area was detected as compared to untreated post-MI rats. By contrast, a disproportionate and significant decrease (40%) of scar weight was observed in dexamethasone-treated post-MI rats (Table 1). Furthermore, an increase in LV/BW ratio was observed in dexamethasone treated post-MI rats compared with untreated rats. However, the latter effect was attributed primarily to the significant loss of body weight. Despite an overall smaller infarct, left ventricular systolic pressure, and the rate of LV contraction and relaxation remained depressed in dexamethasone-treated MI rats and was comparable to untreated post-MI rats. However, dexamethasone administration to post-MI rats normalized the modest increase of LVEDP (Table 2).

### **Molecular remodeling of the non-infarcted left ventricle and the effect of dexamethasone**

To assess the hypertrophic response of the non-infarcted left ventricle, a semi-quantitative measure of the putative marker ANP was performed (3, 9). In 1-week post-MI rats, ANP mRNA was significantly increased in the non-infarcted left ventricle (Figure 1). In dexamethasone-treated sham rats, ANP mRNA expression was similar to sham (data not shown). Following the administration of dexamethasone to post-MI rats, elevated ANP mRNA levels were significantly attenuated in the non-infarcted left ventricle (Figure 1). Likewise, a reactive fibrotic response was evident in the non-infarcted left ventricle of 1-week post-MI rats, as reflected by the increased expression of collagen  $\alpha_1$  type 3 mRNA (Figure 1). Dexamethasone treatment had no effect on mRNA expression in sham rats (data not shown) but normalized collagen  $\alpha_1$  type 3 mRNA levels in the non-infarcted left ventricle of post-MI rats (Figure 1).

### **Effect of dexamethasone on sympathetic fibre innervation of the infarct region, GAP43 and nerve growth factor expression**

The disproportionate reduction of infarct weight versus surface area in dexamethasone-treated post-MI rats supports the premise that various cellular events implicated in scar formation and healing were adversely influenced. We and others have demonstrated that infarct formation was associated with sympathetic fibre innervation (9, 28, 31). To evaluate the neural component of scar formation, neurofilament-M fibre density was determined. In the infarct region of untreated 1-

week post-MI rats (n=3), neurofilament-M immunoreactive fibres were evident with a calculated density of  $1116 \pm 250 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$  (normalized to scar area) (Figures 2 & 3). Furthermore, neurofilament-M fibres were detected in close proximity to a modest number of eNOS immunoreactive vessels residing in the infarct region (Figure 2). In dexamethasone-treated MI rats, impaired scar healing was associated with a marked and significant ( $p < 0.05$ ) reduction of neurofilament-M fibre density in the infarct region ( $125 \pm 47 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ; n=3), as compared to non-treated MI rats (Figure 3). Consistent with these data, the expression of GAP43, a marker of axonal growth (31), was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats ( $0.37 \pm 0.01$ ; n=4) compared with untreated post-MI rats ( $0.83 \pm 0.02$ ; n=4) (Figure 4). Lastly, the loss of sympathetic fibre innervation in the scar following dexamethasone treatment may be attributed at least in part to an attenuation of neurotrophin expression. NGF mRNA expression was significantly reduced in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats compared to untreated post-MI rats (Figure 5).

### **Effect of dexamethasone on myofibroblast growth and NGF mRNA expression**

Myofibroblasts, characterized by smooth muscle  $\alpha$ -actin expression play a seminal role in scar healing (27). In addition to the synthesis and secretion of extracellular matrix proteins required for scar formation, myofibroblasts represent a cellular source of the neurotrophin NGF (9). Thus, we tested the hypothesis that impaired sympathetic fibre innervation of the dexamethasone-treated post-MI rats was attributed at least in part to an attenuation of myofibroblast proliferation and/or

reduced expression of NGF. In dexamethasone-treated post-MI rats, smooth muscle  $\alpha$ -actin protein content in the infarct region was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced ( $0.29 \pm 0.01$ ;  $n=4$ ) compared with the scar region of untreated MI rats ( $0.41 \pm 0.013$ ;  $n=4$ ) (Figure 4). The latter data suggests that dexamethasone may have attenuated myofibroblast proliferation. However, the concomitant expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin in the vasculature of scar-residing vessels limited the interpretation of the data. To directly ascertain the effect of dexamethasone on myofibroblast proliferation and NGF mRNA expression, cells were isolated from the scar of 1-week post-MI rats. Dexamethasone treatment of 1<sup>st</sup> passage scar myofibroblasts ( $n=3$ ) caused a dose-dependent suppression of  $^3\text{H}$ -thymidine uptake (Figure 6). In parallel, the 24 hr exposure of 1<sup>st</sup> passage scar myofibroblasts to dexamethasone ( $10^{-8}$  M) significantly reduced NGF mRNA expression (Figure 5).

## DISCUSSION

Numerous studies have reported that corticosteroid therapy administered early after coronary artery occlusion leads to abnormal infarct formation (2, 26). In some cases, impaired wound healing of the damaged heart following corticosteroid treatment led to cardiac rupture (26). In the present study, dexamethasone administration one day following complete coronary artery occlusion in the rat heart and continued for 6 days led to inadequate scar healing and was associated with a marked reduction of neurofilament-M fibre innervation of the infarct region. The latter effect may be related in part to dexamethasone-mediated inhibition of

myofibroblast proliferation and the concomitant attenuation of NGF mRNA expression.

Although infarct wall thickness was not directly measured in the present study, the significant reduction of scar weight and disproportionate non-significant decrease of scar surface area following dexamethasone treatment were consistent with scar thinning. Furthermore, the modest reduction of overall infarct size in dexamethasone-treated post-MI rats was not associated with an amelioration of either left ventricular systolic pressure or the rate of left ventricular contraction and relaxation. In fact, the hemodynamic profile was comparable to that observed in untreated post-MI rats. Thus, persistent ventricular dysfunction in dexamethasone-treated post-MI rats may be secondary to the inadequate healing of the ischemic region. Consistent with this concept, interventions begun early following coronary artery occlusion that led to increased infarct wall thickness were associated with improved left ventricular function (7, 15). By contrast, the modest increase of LVEDP detected in untreated post-MI rats was normalized following dexamethasone administration. This result may be related in part to the suppressive action of dexamethasone on reactive fibrosis as elevated collagen  $\alpha_1$  type 3 mRNA levels were normalized in the non-infarcted left ventricle of treated post-MI rats.

Previous studies have reported a reduction of body weight gain following corticosteroid treatment (25). A similar observation was reported in the present study and the loss of body weight in dexamethasone-treated MI rats prevented an interpretation regarding the status of the hypertrophic response of the non-infarcted left ventricle, as measured by the LV/BW ratio. In this regard, ANP mRNA

expression was used as a surrogate measure to establish a hypertrophic response of the non-infarcted left ventricle in untreated post-MI rats and subsequent modulation by dexamethasone (3, 9). ANP mRNA levels were significantly increased in the non-infarcted left ventricle of untreated post-MI rats. Dexamethasone treatment of post-MI rats partially reduced ANP mRNA expression suggesting that the hypertrophic response was attenuated. This finding suggests that the partial suppression of the compensatory hypertrophic response in the presence of inadequate scar healing may have further contributed to the depressed contractile status of dexamethasone treated post-MI rats.

A seminal feature of cutaneous wound healing is sympathetic and sensory fibre innervation (12, 17, 20). In the ischemically damaged canine and rat myocardium, sympathetic fibres were likewise reported innervating the infarct region (9, 28, 31). Consistent with previous studies, neurofilament-M fibres were detected in the infarct region of 1-week post-MI rats and observed in close proximity to a modest number of eNOS immunoreactive scar-residing vessels. A similar paradigm was observed in the damaged skin as sensory fibres were reported adjacent to blood vessels immunoreactive to von Willebrand factor (20). Functionally, it has been demonstrated that either chemical or surgical denervation of sensory and/or sympathetic fibres delays and/or attenuates the healing process (1, 5, 17-19, 24). The underlying mechanism attributed to the latter effect may be related in part to a decrease of *de novo* blood vessel formation secondary to the loss of locally secreted neurotrophins (e.g. brain-derived neurotrophic factor and/or nerve growth factor) (8, 11). Thus, it is tempting to speculate that sympathetic fibres detected in close



proximity to blood vessels in the infarct region of the ischemically damaged heart may likewise participate in the angiogenic response. With regard to dexamethasone, previous studies have demonstrated that *in vivo* administration inhibited neurogenesis (16). In the present study, the inadequate reparative fibrotic response observed in dexamethasone-treated post-MI rats was associated with a marked reduction of neurofilament-M fibres innervating the infarct region. Consistent with this finding, expression of GAP43, a putative marker of axonal growth was markedly reduced in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats (31). Thus, based on the postulated relationship between neurogenesis and angiogenesis, *de novo* blood vessel formation in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats may have been likewise compromised because of the significant reduction of innervating sympathetic fibres. However, this relationship cannot be directly established in the present model as a direct angiostatic action of dexamethasone was previously reported during tumor angiogenesis and following cutaneous injury and was attributed at least in part to an inhibition of VEGF expression (29, 30).

In the infarcted canine heart, an increased expression of NGF was identified in the viable myocardium and infarct region and postulated to participate in sympathetic fibre growth (31). Consistent with this finding, NGF mRNA was likewise detected in the infarct region of 1-week post-MI rats. Furthermore, in dexamethasone-treated post-MI rats, NGF mRNA levels in the scar were significantly reduced and may represent an underlying mechanism contributing in part to the reduction of sympathetic fibre innervation of the infarct region. Within the scar, myofibroblasts, characterized by the expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin,

participate in scar healing via the synthesis and secretion of extracellular matrix proteins and represent an important cellular source of NGF (9, 27). Moreover, infiltrating myofibroblasts detected during cutaneous wound healing likewise synthesize and secrete the neurotrophin NGF (14). Thus, on the basis of these data, the decreased expression of NGF mRNA in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats may represent a direct effect of the corticosteroid on either myofibroblast proliferation and/or gene expression. In the present study, smooth muscle  $\alpha$ -actin protein content was decreased in the infarct region of dexamethasone-treated post-MI rats. However, it remains equivocal whether the latter finding was attributed exclusively to a reduction of the myofibroblast population as scar-residing vessels represent an additional source of smooth muscle  $\alpha$ -actin. Nonetheless, the *in vivo* finding provided the impetus to directly examine the effect of dexamethasone on scar myofibroblast growth and gene expression in an *in vitro* setting. The treatment of 1<sup>st</sup> passage scar myofibroblasts with dexamethasone caused a dose-dependent inhibition of <sup>3</sup>H-thymidine uptake. Furthermore, the growth-suppressing action of dexamethasone was associated with a concomitant attenuation of NGF mRNA expression. Consistent with the latter finding, previous studies have reported that dexamethasone treatment reduced NGF expression in eosinophils and 3T3-L1 adipocytes (22, 23). Collectively, these data demonstrate that scar myofibroblasts represent a cellular target of dexamethasone and the concomitant attenuation of proliferation and NGF mRNA expression may have contributed in part to the significant loss of neurofilament-M fibres innervating the infarct region. Moreover, the inadequate reparative fibrotic response observed in dexamethasone treated post-

MI rats may be further related to the antiproliferative action on scar myofibroblasts, independent of sympathetic fibre innervation.

The seminal finding of the present study was that impaired scar healing in dexamethasone-treated post-MI rats was associated with a reduction in the density of neurofilament-M fibres innervating the infarct region. The latter effect may be related at least in part to dexamethasone-mediated attenuation of myofibroblast proliferation and NGF mRNA expression. These observations are compatible with the findings reported in the damaged skin that nerve fibre innervation and myofibroblasts are integral events required for the rapid and efficient healing. Further studies are required to ascertain the relative contribution of sympathetic fibres in scar formation and healing in the ischemically damaged heart.

## **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". Viviane El-Helou is a Ph.D student funded by the Canadian Institutes of Health Research. I would like to thank France Thériault for excellent secretarial assistance.

## LEGENDS

**Figure 1.** *Molecular remodeling of the non-infarcted left ventricle of untreated post-MI rats and dexamethasone-treated post-MI rats.*

ANP and collagen  $\alpha_1$  type 3 mRNAs were significantly increased in the non-infarcted left ventricle of 1-week post-MI rats (n=5) compared with sham rats (n=5). The treatment of post-MI rats (n=7) with dexamethasone (DEX) attenuated ANP mRNA expression and normalized collagen  $\alpha_1$  type 3 mRNA levels. Treatment of sham rats with dexamethasone had no effect on either ANP or collagen mRNA expression (data not shown). Data are represented as fold change versus sham or dexamethasone-treated sham rats, (\*) denotes  $p < 0.05$  versus sham and (\*\*) denotes  $p < 0.05$  versus untreated post-MI rats. Data was evaluated by a two-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman-Keuls post-hoc test.

**Figure 2.** *Anatomic relationship between neurogenesis and angiogenesis in the infarct region.*

(Panel A) Neurofilament-M (green fluorescence) immunoreactive fibres were detected in close proximity to a small calibre vessel as reflected by eNOS (red fluorescence) immunoreactivity of endothelial cells. eNOS immunoreactivity was not detected in the vascular wall and ToPro3 (blue fluorescence) was used to stain the nucleus. Furthermore, the background Alexa-488 fluorescence signal (green) was modestly increased to highlight the vascular wall. (Panel B) This figure represents an additional example of neurofilament-M immunoreactive fibres in close proximity to

small calibre vessels (denoted by asterisk) in the infarct region containing eNOS immunoreactive endothelial cells.

**Figure 3.** *Dexamethasone and sympathetic fibre innervation of the infarct region.*

(Panel A) In untreated post-MI rats, numerous neurofilament-M fibres (indicated by arrow) were detected innervating the infarct region. (Panel B) Represents the phase contrast photo of panel A. (Panel C) In dexamethasone-treated post-MI rats, neurofilament-M fibre immunoreactivity was significantly reduced in the infarct region. (Panel D) Represents the phase contrast photo of panel C.

**Figure 4.** *Smooth muscle  $\alpha$ -actin (SM  $\alpha$ -actin) and GAP43 protein expression in the infarct region and effect of dexamethasone (DEX).*

In DEX-treated post-MI rats (DEX+MI), SM  $\alpha$ -actin and GAP43 protein levels in the infarct region were significantly decreased compared with untreated post-MI rats (MI). SM  $\alpha$ -actin and GAP43 protein levels were normalized to GAPDH protein content.

**Figure 5.** *Effect of dexamethasone (DEX) on NGF mRNA expression in the infarct region and isolated scar myofibroblasts.*

(Panel A) DEX treatment of post-MI rats (DEX+MI;n=6) significantly reduced NGF mRNA expression in the infarct region, as compared to untreated post-MI rats (MI;n=7). Data were evaluated by a Students' unpaired t-test. (Panel B) In 1<sup>st</sup>

passage scar myofibroblasts (n=3), DEX ( $10^{-8}$  M) treatment for 24 hours significantly reduced NGF mRNA expression. Data was evaluated by a Students' paired t-test. (\*) denotes  $p < 0.05$  versus untreated post-MI rats or isolated scar myofibroblasts.

**Figure 6.** *Suppressive action of dexamethasone on DNA synthesis in isolated scar myofibroblasts.*

Dexamethasone treatment of 1<sup>st</sup> passage myofibroblasts (n=3) caused a dose-dependent decrease of  $^3\text{H}$ -thymidine uptake. (\*) denotes  $p < 0.05$  versus untreated myofibroblasts as assessed by a one-way ANOVA.

## REFERENCES

1. Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodelling of human burn wound scar. *Burns* 27: 717-722, 2001.
2. Bulkley BH and Roberts WC. Steroid therapy during acute myocardial infarction. A cause of delayed healing and of ventricular aneurysm. *Am J Med* 56: 244-250, 1974.
3. Calderone A, Abdelaziz N, Colombo F, Schreiber KL, Rindt H. A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocyte hypertrophy and gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1127-1140, 2000.
4. Carr RW, Delaney CA, Westerman RA, Roberts RG. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* 4: 467-470, 1993.
5. Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 18: 371-378, 1996.
6. Calderone A, Bel-Hadj S, Drapeau J, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L. Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol* 207: 165-173, 2006.
7. Dai W, Wold LE, Dow JS, Kloner RA. Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats. *J Am Coll Cardiol* 46: 714-719, 2005.
8. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL. Brain derived neurotrophic factor is an



endothelial survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127: 4531-4540, 2000.

9. 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.* 204: 51-62, 2005.

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

11. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* 106: 2257-2262, 2002.

12. Engin C, Demirkan F, Ayhan S, Atabay K, Baran NK. Delayed effect of denervation on wound contraction in rat skin. *Plast Reconstr Surg* 98: 1063-1067, 1996.

13. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53: 31-47, 2002.

14. Hasan W, Zhang R, Liu M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and alpha-smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res.* 300: 97-109, 2000.

15. Hayakawa K, Takemura G, Kanoh M, Li Y, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Inhibition of granulation tissue

cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodelling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation* 108: 104-109, 2003.

16. Kanagawa T, Tomimatsu T, Hayashi S, Shioji M, Fukuda H, Shimoya K, Murata Y. The effect of repeated corticosteroid administration on the neurogenesis in the neonatal rat. *Am J Obstet Gynecol* 194: 231-238, 2006.

17. Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* 6: 194-201, 1998.

18. Kishimoto S, Maruo M, Ohse C, Yasuno H, Kimura H, Nagai T, Maeda T. The regeneration of the sympathetic catecholaminergic nerve fibers in the process of burn wound healing in guinea pigs. *J Invest Dermatol* 79: 141-146, 1982.

19. Kjartansson J, Dalsgaard CJ, Jonsson CE. Decreased survival of experimental critical flaps in rats after sensory denervation with capsaicin. *Plastic Reconstr Surg* 79: 218-221, 1987.

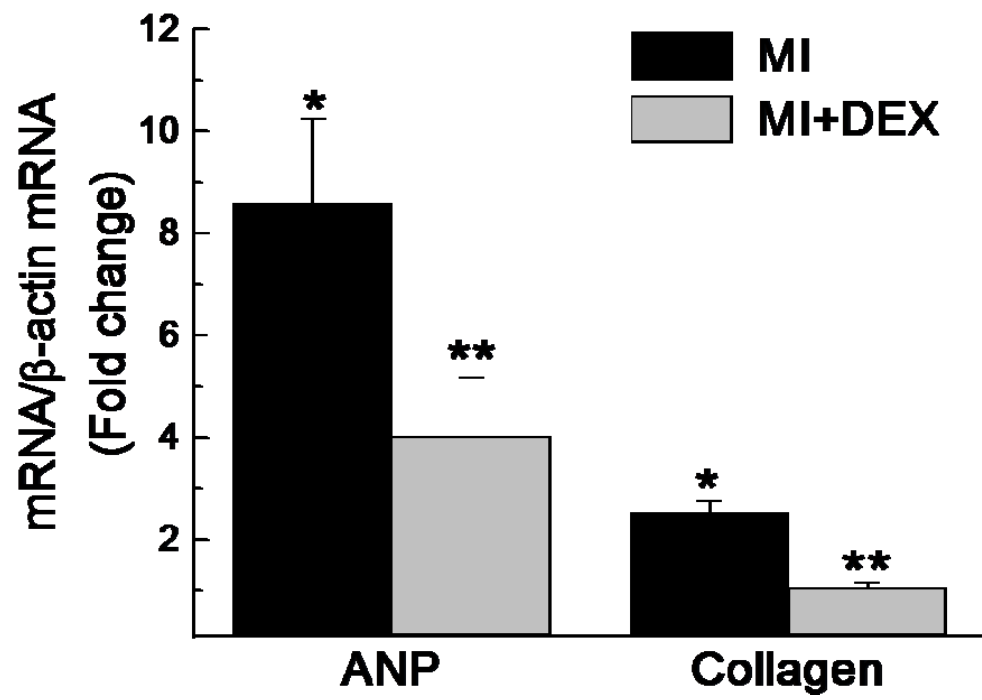
20. Liu M, Warn JD, Fan Q, Smith PG. Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell Tissue Res.* 297: 423-433, 1999.

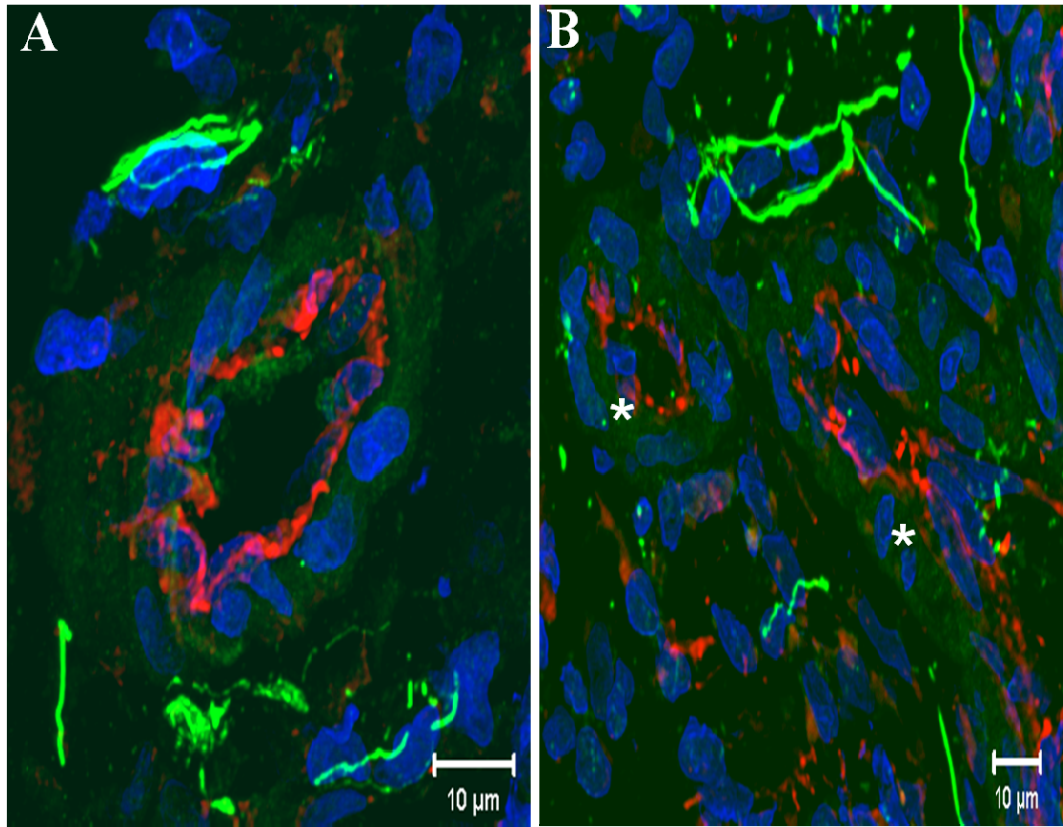
21. Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Rouleau JL, and Calderone A. AT<sub>1</sub> receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol* 2003;138:1485-94.

22. Noga O, Hanf G, Gorges D, Dinh QT, Groneberg DA, Suttorp N, Kunkel G. Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Regul Pept* 132: 74-79, 2005.
23. Peeraully MR, Jenkins JR, Trayhurn P. NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E331-E339, 2004.
24. Perez E, Lopez-Briones LG, Gallar J, Belmonte C. Effects of chronic sympathetic stimulation on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 221-224, 1987.
25. Scheuer DA and Mifflin SW. Chronic corticosterone treatment increases myocardial infarct size in rats with ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 272: R2017-R2024, 1997.
26. Sholter DE and Armstrong PW. Adverse effects of corticosteroids on the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* 16: 505-511, 2000.
27. Sun Y and Weber KT. Infarct scar: A dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 46: 250-256, 2000.
28. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium. *Lab Invest.* 63: 490-501, 1990.
29. Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y, Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 15:3003-3309, 2006.

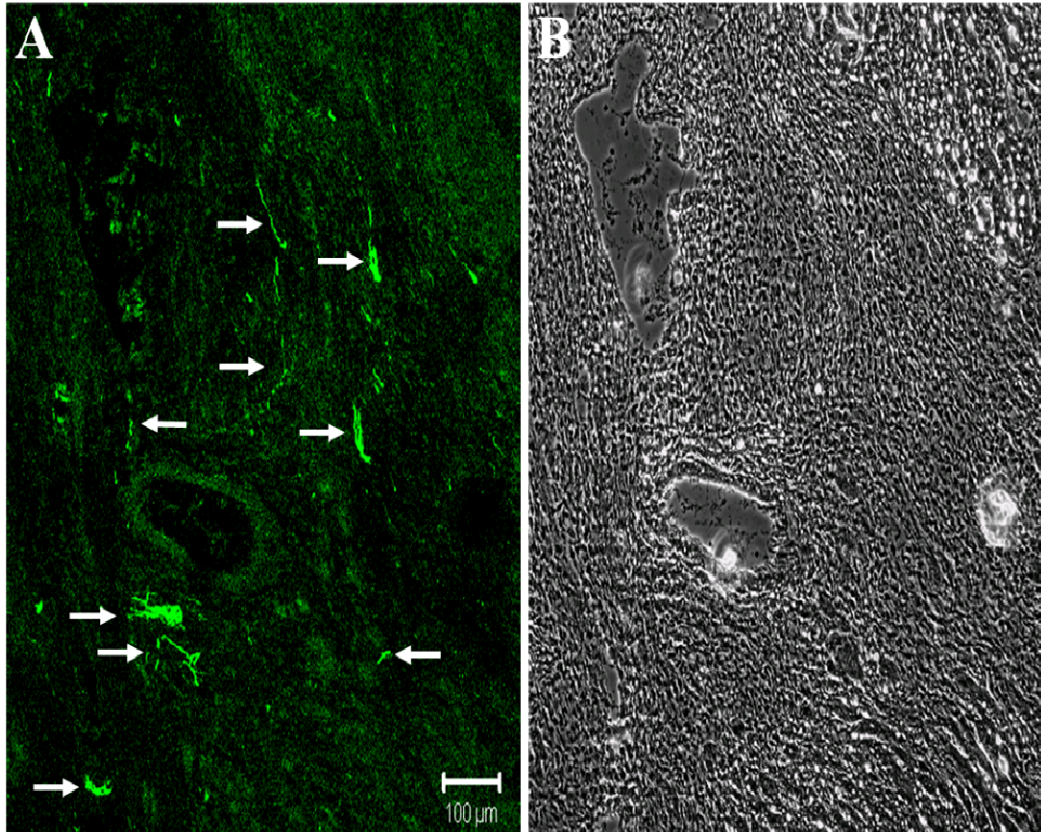
30. Zhang N, Fang Z, Contag PR, Purchio AF, West DB. Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood* 15:617-626, 2004.
31. Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, Fishbein MC, Sharifi B, Chen PS. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res.* 95: 76-83, 2004.

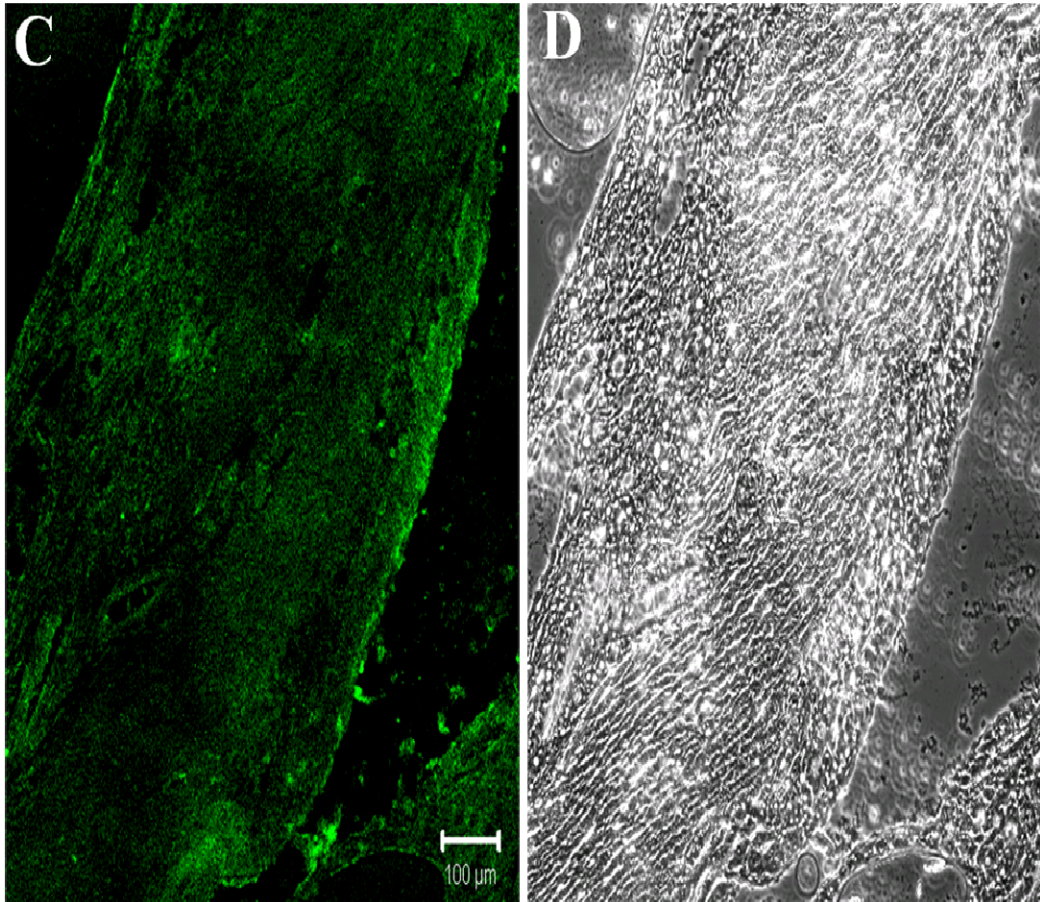
Figure 1



**Figure 2**

Figures 3A &amp; 3B



**Figures 3C & 3D**



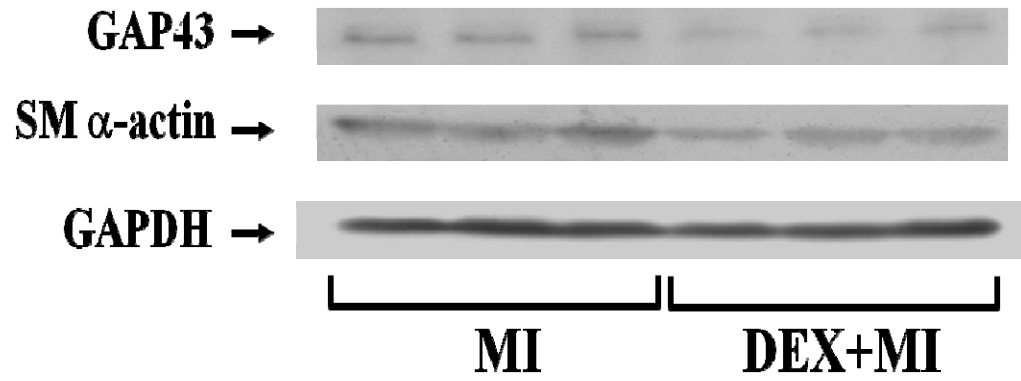
**Figure 4**

Figure 5A

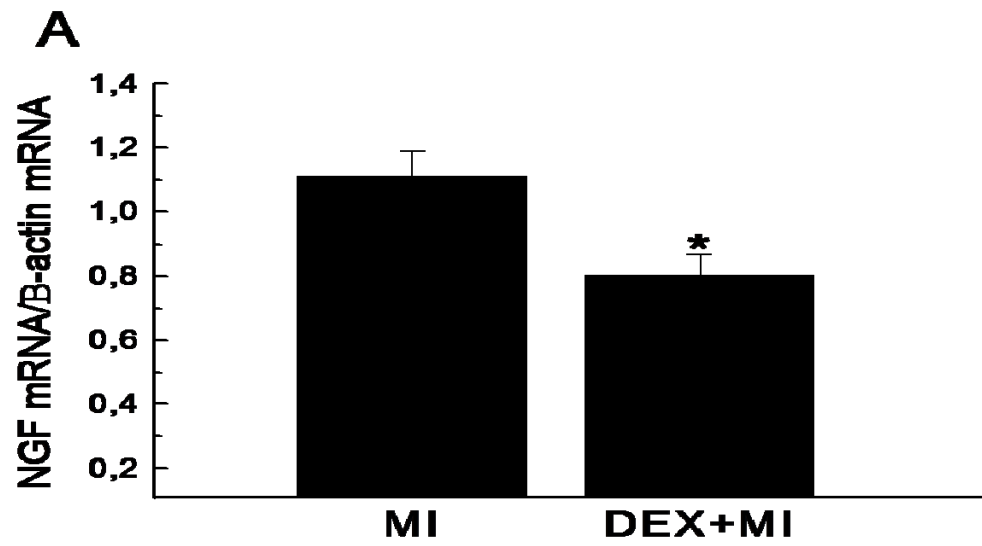


Figure 5B

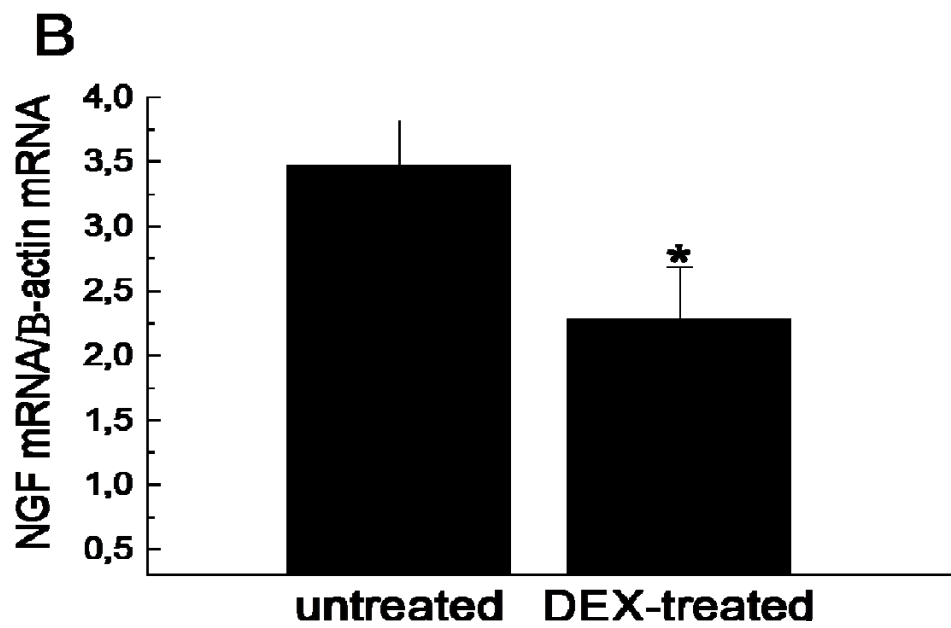
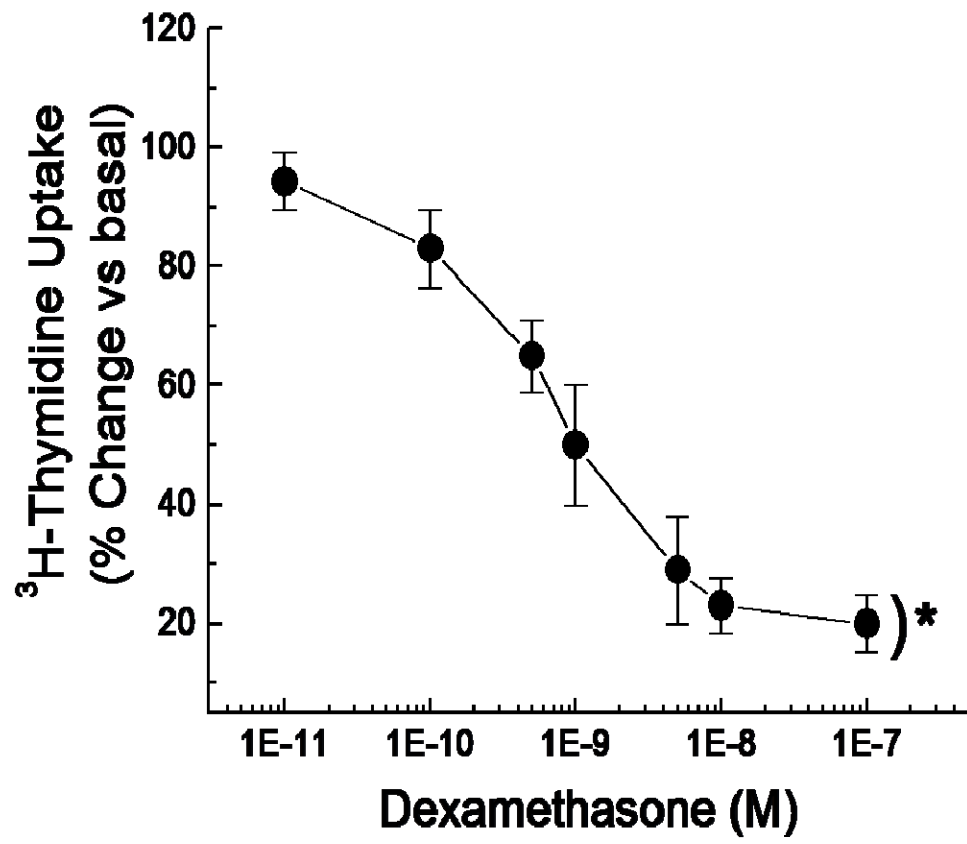


Figure 6



**Table 1. Body and heart weights of sham and 1-week post-myocardial infarcted rats and the effect of dexamethasone (DEX)**

	BW	LV	LV/BW	RV	RV/BW	Scar	Scar
	(gram)	(mg)	(mg/gram)	(mg)	(mg/gram)	Weight (mg)	Surface Area (cm <sup>2</sup> )
Sham (n=8)	315±5	501±36	1.58±0.09	161±21	0.51±0.03	--	
MI (n=11)	314±3	417±18	1.34±0.02 <sup>a</sup>	163±17	0.53±0.02	63±2	0.68±0.06
DEX+Sham (n=8)	228±3 <sup>a</sup>	484±10	2.13±0.09 <sup>a</sup>	147±4	0.64±0.02 <sup>a</sup>	--	
DEX+MI (n=11)	229±2 <sup>a</sup>	418±22	1.83±0.06 <sup>a</sup>	130±4 <sup>a</sup>	0.56±0.02 <sup>c</sup>	38±4 <sup>b</sup>	0.54±0.06

MI indicates myocardial infarction; BW, body weight; LV, left ventricle; and RV, right ventricle. Data are presented as mean±S.E.M, (a) represents p<0.05 versus sham, (b) p<0.05 versus MI, (c) p<0.05 versus DEX+sham, and (n) number of rats examined. Data was evaluated by a two-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman-Keuls post-hoc test. Scar weight and surface area were evaluated with a Student's unpaired t-test.

**Table 2. Hemodynamic parameters of sham and myocardial infarcted rats and the effect of dexamethasone (DEX)**

	LVSP	LVEDP	LV+dP/dt	LV-dP/dt
	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg/sec)	(mmHg/sec)
Sham ( <i>n</i> =8)	143±10	11±1	6655±305	5407±224
MI ( <i>n</i> =8)	111±6 <sup>a</sup>	16±2 <sup>a</sup>	5091±226 <sup>a</sup>	3761±207 <sup>a</sup>
DEX+Sham ( <i>n</i> =8)	122±3 <sup>a</sup>	10±1	7143±339	4959±200
DEX+MI ( <i>n</i> =8)	111±6 <sup>a</sup>	10±1 <sup>b</sup>	5590±255 <sup>a,c</sup>	4040±216 <sup>a,c</sup>

MI indicates myocardial infarction; DEX, dexamethasone; LVSP, left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; +dP/dt, rate of contraction; -dP/dt, rate of relaxation. Data were presented as mean±S.E.M, (a) represented  $p<0.05$  versus sham, (b)  $p<0.05$  versus MI, (c)  $p<0.05$  versus DEX+sham, and (*n*) number of rats examined. Data was evaluated by a two-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman-Keuls post-hoc test.

## **Chapitre 5 DISCUSSION**

## **I. Sommaire des nouvelles découvertes**

L'étude présentée dans le chapitre 2 identifie pour la première fois une nouvelle population cellulaire constituée de cellules souches neuronales nestine positives au niveau du cœur adulte non endommagé de rats. Ces cellules possèdent des structures en fibres retrouvées partout dans le myocarde. De plus, suite à un infarctus du myocarde, l'expression de nestine dans le myocarde infarci et non infarci est augmentée de façon significative. Les cellules souches neuronales nestine positives ne sont pas dérivées de la moelle osseuse mais plutôt résidentes dans le cœur. Ceci a été démontré par l'injection des cellules non fractionnées de la moelle osseuse couplées au GFP chez des rats préalablement irradiés. En effet, suite à un infarctus du myocarde, ces cellules migrent vers la région infarctée mais seul un faible nombre de cellules GFP positives/nestine positives est détecté au niveau de la cicatrice. Cette étude présente aussi des données relatives à l'innervation sympathique du cœur. Elle est la première à souligner une différence régionale au niveau de la proximité physique des fibres nestine positives et des fibres sympathiques NF-M positives. Dans la région infarctée, contrairement à ce que nous observons dans la région non infarctée, les fibres nestine positives semblent être associées physiquement aux fibres NF-M positives. L'ensemble de ces données suggèrent une participation potentielle de ces cellules dans le remodelage cardiaque suite à un dommage et elles sont à la base de l'étude présentée dans le chapitre 3.

Dans l'étude du chapitre 3, nous avons isolé les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques par la méthode de culture sous forme de neurosphères et nous avons approfondi nos connaissances sur ce type cellulaire. Ces cellules

expriment différents marqueurs de la crête neurale comme *musashi-1*, *sox9*, *slug* et *snail*. L'utilisation du modèle de souris transgénique Cre-Lox qui expriment la protéine fluorescente verte augmentée (*Enhanced GFP*; EGFP) dans les tissus dérivés de la crête neurale nous a permis de déterminer de façon directe l'origine de ces cellules comme étant des cellules dérivées de la crête neurale. Cet article est le premier à identifier deux rôles pour ces cellules souches neuronales nestine positives et ce, au niveau de la réponse angiogénique et de la réinnervation sympathique de la région cicatricielle. Une partie des résultats présentés dans ce papier, fondée sur l'utilisation des modèles d'ischémie/reperfusion, d'infarctus du myocarde et d'animaux traités avec la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), montre que les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques sont impliquées dans la réinnervation sympathique du cœur suite à un dommage. Nos données suggèrent que les fibres nestine positives agissent comme guide pour la croissance axonale. Une autre partie de nos résultats montre que les cellules souches neuronales nestine positives ont la capacité de former des vaisseaux *de novo* (angiogenèse) au niveau de la cicatrice. Ces cellules s'incorporent également dans certains vaisseaux de larges calibres.

L'intérêt de l'étude du chapitre 4 est axé sur les événements cellulaires nécessaires pour une cicatrisation adéquate suite à un infarctus du myocarde. L'utilisation du modèle des animaux traités avec le glucocorticoïde dexaméthasone (DEX) provoque une réduction disproportionnée du poids de la cicatrice par rapport à sa surface illustrant ainsi l'amincissement de cette dernière. Nos données démontrent que le premier événement contribuant à la formation mal adaptative de la



cicatrice cardiaque est une diminution importante de la densité des fibres sympathiques. Le deuxième événement est l'effet direct du traitement avec DEX sur les myofibroblastes. DEX cause une diminution simultanée de la prolifération des myofibroblastes ainsi que de la production *in vitro* du facteur neurotrophique NGF par ces derniers. En parallèle, chez les animaux traités avec DEX, une réduction de la production du NGF est observée au niveau de la région infarctée. Cette baisse des niveaux du NGF pourrait être associée directement à la diminution de la densité des fibres sympathiques. Cette publication souligne ainsi l'importance d'une interaction essentielle entre les fibres sympathiques et les myofibroblastes lors de la fibrose de réparation. De plus, nous démontrons une association physique entre les fibres sympathiques et les vaisseaux résidents dans la région cicatricielle.

## **II. Importance physiologique des résultats présentés dans cette thèse**

Suite à un infarctus du myocarde, la réparation tissulaire est associée à la présence de différents constituants cellulaires dans la région endommagée notamment les myofibroblastes, les cellules vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses), les cellules nestine positives ayant un phénotype de cellules souches neuronales et les fibres sympathiques (Drapeau J et al., 2005; Frangogiannis NG et al., 2002; Sun Y et Weber KT, 2000; Vracko R et al., 1990). Le rôle des deux dernières composantes suite à un dommage ischémique est indéterminé. La contribution des myofibroblastes et du processus angiogénique dans la fibrose de réparation est par contre un aspect bien caractérisé dans la littérature.

Une cicatrisation adéquate requiert la présence des myofibroblastes et la formation de nouveaux vaisseaux dans la région endommagée. En effet, il a été démontré que la production de niveaux élevés de protéines extracellulaires par les myofibroblastes amène le développement d'une cicatrice rigide empêchant ainsi son expansion. Une diminution de la prolifération des myofibroblastes et de la synthèse de collagène provoque une perturbation de la réparation tissulaire menant à l'amincissement de la cicatrice et à la dilatation ventriculaire (Sholter DE et Armstrong PW, 2000; Fazel S et al., 2006; Cimini M et al., 2007). Une augmentation de la présence de ces cellules dans la région infarctée est donc associée à un remodelage cicatriciel adéquat et par conséquent, à une amélioration de la fonction ventriculaire. L'importance des myofibroblastes dans la fibrose de réparation a été

aussi soulignée par l'injection du collagène au niveau de la région infarctée qui résulte en une augmentation de l'épaisseur de la cicatrice et en une amélioration de la fonction ventriculaire (Dai W et al., 2005). L'angiogenèse joue également un rôle fondamental dans la formation de la cicatrice. La régénération tissulaire doit être accompagnée d'une réponse angiogénique qui est nécessaire pour alimenter et oxygéner les différentes populations cellulaires de la région infarctée. Elle contribue à l'épaississement de la cicatrice limitant son expansion et ainsi, la dilatation ventriculaire (Barandon L al., 2003; Wang Y et al., 2004; Lindsey ML et al., 2002).

Au niveau de la région infarctée, les cellules nestine positives ainsi que l'innervation sympathique sont deux composantes peu documentées et leur participation dans la formation de la cicatrice demeure inconnue. La découverte au niveau cardiaque des cellules nestine positives soulève plusieurs questions liées principalement à leur origine, leur phénotype ainsi que leur rôle physiologique. Ces cellules possèdent plusieurs points communs avec les cellules souches neuronales du cerveau ainsi que les cellules progénitrices de la peau. Les hypothèses de nos études ont ainsi été fondées sur les concepts connus dans la littérature sur ces deux derniers types cellulaires.

Les études présentées dans cette thèse solidifient nos connaissances sur les cellules nestines positives identifiées dans le cœur et montrent des données relatives à leurs rôles potentiels dans le remodelage cicatriciel. De plus, la contribution de l'innervation sympathique dans la fibrose de réparation ainsi que l'importance des myofibroblastes cicatriciels dans la régénération des fibres sympathiques sont démontrées. À travers ces études, nous soulignons aussi l'importance de l'interaction

entre les différentes composantes cellulaires impliquées dans la réparation adéquate de la région infarctée.

## **1. Caractérisation des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques**

### **1.1 Phénotype et Distribution des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques**

Les nouvelles cellules identifiées par notre laboratoire ont été classées comme étant des cellules souches neuronales et ce, selon différents critères. Premièrement, elles expriment le filament intermédiaire nestine qui est un marqueur des cellules souches neuronales (Lendahl U et al., 1990; Hockfield S et McKay RD, 1985). Deuxièmement, elles poussent sous forme de structures sphériques appelées neurosphères en présence de l'EGF et du FGF. Finalement, elles sont multipotentes et capables de se différencier en différents types cellulaires tels que des cellules neuronales, gliales, endothéliales et musculaires lisses. De plus, dans une récente publication, nous démontrons le potentiel de ces cellules de générer de nouveaux cardiomyocytes, un concept qui sera discuté ultérieurement (Béguin PC et al., 2009). Notons que le milieu cicatriciel contient des éléments nécessaires favorisant la différenciation de ces cellules notamment des facteurs neurogéniques et angiogéniques (NGF, BDNF, VEGF, TGF-beta, angiotensine II, endothéline-1)

(Drapeau J et al., 2005; Frangogiannis NG et al., 2002; Sun Y et Weber KT, 1996b; Manabe I et al., 2002).

Nous avons détecté ces cellules souches neuronales nestine positives chez trois espèces. Elles sont retrouvées au niveau de cœurs normaux et infarcis de rats et de souris adultes. Les cellules souches neuronales nestine positives sont aussi observées chez les rats et les souris néonataux (1-3 jours). Chez le rat, elles ont également été observées au niveau des oreillettes. Les cellules souches neuronales nestine positives sont aussi détectées dans les cœurs infarcis humains dans la cicatrice ainsi que dans l'espace interstitiel entre les cardiomyocytes de la région non infarctée. D'ailleurs, leur présence chez l'humain renforce notre intérêt pour ce type cellulaire.

## 1.2 Origine des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques

Nous avons confirmé par plusieurs techniques la présence endogène des cellules souches neuronales nestine positives dans le myocarde normal. Ces cellules ne sont pas dérivées de la moelle osseuse. En effet, suite à l'injection de cellules non fractionnées de la moelle osseuse couplées au GFP chez des rats préalablement irradiés, un faible nombre de cellules GFP positives est observée au niveau de la région infarctée. De plus, la majorité de ces cellules GFP positives sont nestine négatives. Ceci démontre alors que les cellules nestine positives retrouvées au niveau de la cicatrice cardiaque ne proviennent pas de la moelle osseuse. D'ailleurs,

d'après le groupe de Fukuhara, seulement 2% des cellules nestine positives de la moelle osseuse sont recrutées suite à un infarctus du myocarde vers la région infarctée et ce, en présence d'un facteur chimioattractant (Fukuhara S et al., 2005). Les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques sont plutôt originaires de la crête neurale. Elles expriment des marqueurs propres à cette dernière notamment nestine, musashi-1 ainsi que plusieurs facteurs transcriptionnels tels que sox9, slug et snail. D'ailleurs, grâce à l'utilisation du modèle de souris transgéniques Cre-Lox qui expriment EGFP dans les tissus dérivés de la crête neurale, nous avons confirmé directement que les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques proviennent de la crête neurale qui, lors de la cardiogenèse, migrent et résident dans le cœur jusqu'à l'âge adulte.

Récemment, certaines études ont confirmé la présence endogène des cellules souches neuronales nestine positives dans le cœur de souris et d'humains notamment le groupe de Scobioala (Scobioala S et al., 2008). Ils démontrent que ces cellules ne proviennent pas de la moelle osseuse. En parallèle, nos résultats sont aussi appuyés par le groupe de Tomita (Tomita Y et al., 2005). Ces chercheurs ont identifié des cellules dormantes dans le cœur nommées "*side population*" qui sont positives à des marqueurs de la crête neurale et qui possèdent un potentiel de différenciation. Ces cellules sont originaires de la crête neurale, expriment les mêmes marqueurs que les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques et poussent en structures sphériques appelées cardiosphères. Elles sont multipotentes car elles se différencient *in vitro* en cardiomyocytes, en neurones, en cellules gliales et en cellules musculaires lisses. De plus, dans cette étude, ces cellules transplantées chez l'embryon migrent

vers le cœur, participent à la septation du "*outflow tract*" et se différencient en cardiomyocytes. Ainsi, les cellules identifiées par ce groupe ressemblent phénotypiquement aux cellules souches neuronales nestine positives que nous observons dans le cœur. Ces résultats nous permettent de spéculer que les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques pourraient se différencier en cellules musculaires lisses ainsi qu'en cardiomyocytes et participer ainsi à la régénération du tissu endommagé.

## **2. Expression du filament intermédiaire nestine dans le cœur endommagé**

Suite à un infarctus du myocarde, une augmentation significative de l'expression de nestine dans la région infarctée et non infarctée est observée. L'augmentation de cette expression pourrait refléter une augmentation de la prolifération des cellules souches neuronales cardiaques. Par contre, nos résultats suggèrent que, suite à un infarctus du myocarde, nestine est aussi exprimée de façon spécifique dans d'autres structures cardiaques soit au niveau de certains cardiomyocytes dans la région infarctée/péri-infarctée et de vaisseaux dans la région infarctée. Par conséquent, nous ne pouvons établir une corrélation directe entre l'augmentation des niveaux de nestine et la prolifération des cellules souches neuronales nestine positives.

En premier lieu, l'augmentation de l'expression de nestine est aussi associée à l'apparition de plusieurs cardiomyocytes nestine positifs au niveau de la région infarctée et péri-infarctée. La caractérisation et l'origine de ces cellules font l'objet d'une récente publication de notre équipe (Beguin PC et al., 2009). Ces cardiomyocytes sont nestine positifs/desmagine positifs et présentent un phénotype immature reflété par une petite taille et un patron d'expression désorganisé de la Cx43. La différenciation potentielle des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques semble être responsable de la génération de ces cardiomyocytes et sera discutée ultérieurement. D'ailleurs, le groupe de Scobioala et de Mokry confirment la présence de cardiomyocytes nestine positifs dans le cœur endommagé (Mokry J et al., 2008; Scobioala S et al., 2008). La détermination des stimuli responsables de l'expression de nestine dans les cardiomyocytes adultes est présentement en cours dans notre laboratoire.

En deuxième lieu, il est important de noter que les cellules endothéliales des vaisseaux présents dans la région infarctée sont aussi immunopositives pour nestine. Au niveau central et périphérique, l'expression de nestine dans les cellules endothéliales a déjà été observée dans les vaisseaux situés dans les régions endommagées. Cette expression est attribuée à la formation de nouvelles structures vasculaires (Mokry J et al., 2004; Amoh Y et al., 2004; Shin HY et al., 2008; Mokry J et al., 2008a; Cízková D et al., 2009). Les recherches en oncologie associent aussi l'expression de nestine dans les cellules endothéliales à l'angiogenèse *de novo* (Dahlstrand J et al., 1992). Ainsi, suite à un infarctus du myocarde, l'expression de



nestine par les cellules endothéliales des vaisseaux en formation peut également contribuer à l'augmentation de l'expression de nestine dans la région infarctée.

L'augmentation de l'expression de nestine dans le cœur infarcté pourrait également être associée à une prolifération des cellules souches neuronales nestine positives suite au dommage. Les travaux présentés dans cette thèse n'examinent pas directement la prolifération de ces cellules suite à l'infarctus du myocarde. Cependant, des études au niveau du système nerveux central montrent une prolifération des cellules souches neuronales nestine positives au cours de la réparation tissulaire (Lin RC et al., 1995; Johansson CB et al., 1999; Rice AC et al., 2003; Kronenberg G et al., 2005). Il est aussi important de noter qu'il est difficile d'établir une corrélation entre les niveaux de nestine et le taux de prolifération des cellules souches neuronales nestine positives. Il est possible que les niveaux de nestine puissent être augmentés suite à une réorganisation du filament dans une cellule en cours de différenciation. En effet, Mokry et al. ont démontré que l'expression de nestine au niveau des cellules endothéliales est attribuée à une réorganisation du cytosquelette au cours de la maturation cellulaire et de l'adaptation aux changements lors de la croissance tissulaire (Mokry J et al., 2008b). Ainsi, une approche directe est nécessaire afin de vérifier si les cellules souches neuronales nestine positives prolifèrent suite à un infarctus du myocarde. Dans notre laboratoire, des expériences sont actuellement en cours utilisant la Bromodeoxyuridine (BrdU) afin d'examiner directement la prolifération des cellules souches neuronales nestine positives suite à un infarctus du myocarde. Le BrdU est un agent synthétique qui s'incorpore au niveau de l'ADN des cellules prolifératives (Muskhelishvili L et al.,

2003; Park DH et al., 2009). Cette technique nous permettra aussi d'évaluer les stimuli impliqués dans la prolifération de ces cellules.

Nous avons précédemment mentionné que plusieurs facteurs de croissance sont présents dans le cœur suite à un infarctus du myocarde tels que l'angiotensine II, l'endothéline-1, le TGF-beta et les catécholamines. Jusqu'à présent, l'effet de ces facteurs sur les cellules souches neuronales nestine positives est inconnu. Dans une récente publication, notre groupe a démontré que les cellules souches neuronales nestine positives expriment le récepteur beta-1 adrénergique. Cependant, l'effet des catécholamines sur les cellules souches neuronales nestine positives reste à déterminer (Beguin PC et al., 2009). De plus, il serait intéressant en premier lieu d'examiner par exemple la présence des récepteurs de l'angiotensine II (AT1 et/ou AT2) et du TGF-beta (T $\beta$ RI et T $\beta$ RII) sur les cellules souches neuronales nestine positives (Manabe I et al., 2002; Bujak M et Frangogiannis NG, 2007). Il faut noter que l'effet de l'angiotensine II sur différents types de cellules souches a été examiné. Plusieurs études démontrent que, suite à l'activation du récepteur AT1, l'angiotensine II induit un stress oxydant conduisant à une dysfonction au niveau des cellules progénitrices endothéliales. Le stress oxydant cause une diminution de la prolifération de ces cellules et mène aussi à leur sénescence (Imanishi T et al., 2005; Yao EH et al., 2007). Par contre, d'autres études démontrent que l'angiotensine II a un effet anti-apoptotique au niveau des cellules progénitrices endothéliales et qu'en présence du VEGF, l'angiotensine II stimule la prolifération de ces cellules (Yin T et al., 2008). De plus, l'angiotensine II stimule la synthèse du VEGF au niveau des cellules souches mésenchymateuses suite à sa liaison au récepteur AT1 (Shi RZ et

al., 2009). L'effet prolifératif de l'angiotensine II a aussi été observé au niveau des cellules souches hématopoïétiques (Rodgers KE et al., 2000). Le rôle de l'endothéline-1 est peu examiné dans la littérature. Une étude démontre que l'endothéline-1 possède un effet prolifératif sur les cellules progénitrices neuronales (Morishita R et al., 2007). L'effet du TGF-beta sur les cellules souches varie selon le type cellulaire examiné et son action semble controversée. Le TGF-beta a des effets anti-apoptotiques au niveau des cellules progénitrices neuronales dérivées de la moelle épinière exposées au stress oxydant (Park SM et al., 2008). Il facilite la prolifération des cellules progénitrices de la peau SKPs et la formation de neurosphères (Kawase Y et al., 2004). En parallèle, le TGF-beta inhibe la prolifération des cellules souches neuronales du cerveau ainsi que la neurogénèse (Wachs FP et al., 2006; Aigner L et Bogdahn U, 2008). Certaines études démontrent le contraire et suggèrent que le TGF-beta a un effet positif sur la neurogénèse (Battista D et al., 2006; Misumi S et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que les facteurs de croissance présents dans le cœur infarcté peuvent potentiellement agir sur les cellules souches neuronales nestine positives.

### **3. Rôle des cellules souches neuronales nestine positives dans le remodelage ventriculaire suite à un infarctus du myocarde**

Suite à un infarctus du myocarde, les cellules souches neuronales nestine positives cardiaque ainsi que les fibres nestine positives sont détectées dans le cœur

endommagé (Drapeau J et al., 2005). La présence des cellules souches neuronales nestine positives dans la cicatrice souligne la capacité de ces cellules à résister au milieu hypoxique. Cette caractéristique pourrait assurer la disponibilité de ces cellules dans la région ischémique favorisant par conséquent leur participation au remodelage cicatriciel. Le ou les rôles des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques dans ce remodelage ventriculaire, suite à un infarctus du myocarde, sont inconnus. Pour évaluer leur contribution au processus de cicatrisation, nous nous sommes basés sur deux concepts différents. Premièrement, au niveau du cerveau et de la peau, l'importance des cellules souches neuronales nestine positives suite à un dommage est bien documentée. Ces cellules possèdent le potentiel de se différencier en cellules endothéliales et/ou musculaires lisses et de former de nouveaux vaisseaux contribuant ainsi à la réponse angiogénique (Oishi K et al., 2004; Wurmser AE et al., 2004; Amoh Y et al., 2004; Tomita Y et al., 2005; Lin RC et al., 1995; Johansson CB et al., 1999; Rice AC et al., 2003). Par conséquent, nous avons examiné si les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques sont impliquées dans la formation de vaisseaux *de novo* au niveau de la cicatrice cardiaque. Deuxièmement, au niveau du muscle squelettique, il a été démontré que les fibres nestine positives retrouvées au niveau des cellules de Schwann sont impliquées dans la régénération axonale. Au cours de ce processus, les cellules de Schwann projettent des extensions nestine positives reliant la cellule dénervée avec les cellules musculaires environnantes. Ces projections nestine positives servent par la suite de guide pour la croissance des axones (Anton ES et al., 1994; Hayworth CR et al., 2006; Kang H et al., 2007). Nous avons alors évalué le

rôle des cellules souches neuronales nestine positives dans la réinnervation sympathique de la cicatrice cardiaque. Ainsi, le but du deuxième article présenté dans cette thèse est d'évaluer deux rôles physiologiques potentiels de ces cellules soient leur participation dans la réponse angiogénique et dans la réinnervation sympathique au niveau de la région infarctée du cœur.

La contribution directe des cellules souches neuronales nestines positives à la réponse angiogénique dans la région infarctée est difficile à évaluer car les vaisseaux présents dans la cicatrice cardiaque expriment aussi le filament nestine (El-Helou et al., 2005). Pour contrer cette problématique, nous avons examiné le rôle des cellules souches neuronales nestine positives dans la formation de vaisseaux de façon directe en les injectant dans le cœur. Isolées à partir des neurosphères, les cellules souches neuronales nestine positives ont été marquées avec la molécule fluorescente CM-DiI et injectées dans le myocarde viable en périphérie de la région infarctée. Ces cellules migrent vers le myocarde endommagé, se différencient en cellules endothéliales ainsi qu'en cellules musculaires lisses et forment plusieurs petits vaisseaux *de novo*. De plus, une incorporation de cellules CM-DiI positives est observée dans quelques larges vaisseaux. D'une part, ces données soulignent le potentiel angiogénique des cellules souches neuronales nestine positives. D'autre part, elles suggèrent que notre population de cellules souches neuronales nestine positives comporte probablement deux sous populations cellulaires pouvant se différencier en deux types de cellules vasculaires différents soient en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses. Les stimuli impliqués dans la différenciation des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques en cellules vasculaires sont indéterminés présentement.

Cependant, le milieu cicatriciel est un environnement hypoxique où plusieurs facteurs de croissance et angiogéniques sont présents tels que le TGF, le VEGF, le NGF, l'endothéline-1 et l'angiotensine II (Drapeau J et al., 2005; Frangogiannis NG et al., 2002; Sun Y et Weber KT, 1996b; Manabe I et al., 2002). Ainsi, il est important d'identifier le ou les facteurs responsables spécifiquement de la différenciation de ces cellules en un type de cellules vasculaires plutôt qu'un autre.

Le deuxième rôle attribué aux cellules souches neuronales nestine positives est leur participation à l'hyperinnervation sympathique suite à un infarctus du myocarde. Des études au niveau de la régénération des nerfs périphériques démontrent l'implication des fibres nestine positives des cellules de Schwann dans le processus de réinnervation (Anton ES et al., 1994; Hayworth CR et al., 2006; Kang H et al., 2007). Suite à une dénervation du muscle squelettique, les cellules de Schwann projettent des fibres nestine positives servant de guide pour la régénération axonale des fibres sympathiques. Comme déjà mentionné, en plus des fibres nestine positives, des fibres sympathiques NF-M positives sont présentes dans le myocarde normal et endommagé. Dans deux modèles de dommage ischémique soient l'ischémie/reperfusion et l'infarctus du myocarde, nous avons observé que les fibres sympathiques situées dans la région infarctée et péri-infarctée ont la particularité d'être associées physiquement avec les fibres nestine positives. Ce phénotype n'est pas observé dans le myocarde non infarcté et normal. Ces observations ainsi que les données sur la régénération axonale périphérique suggèrent que les fibres nestine jouent un rôle de guide pour la croissance des fibres sympathiques suite à un

dommage. En parallèle, ces résultats ont été confirmés par le modèle de rats traités avec la 6-OHDA. Ce traitement provoque la dénervation du cœur (sympathectomie) suite à la dégradation des fibres sympathiques (Mircoli L et al., 2002; Kim LR et al., 1998). La 6-OHDA est une substance neurotoxique qui détruit les nerfs sympathiques sans détruire le corps cellulaire. La régénération des fibres sympathiques a lieu en présence d'une augmentation des niveaux de l'ARNm du facteur neurotrophique NGF et elle se produit aussi en association avec les fibres nestine positives. Ces résultats suggèrent que les cellules souches neuronales nestine positives participent à la réinnervation sympathique au niveau du cœur endommagé. Comme déjà mentionné, nous démontrons que, suite au traitement avec la 6-OHDA, les niveaux de l'ARNm du NGF sont augmentés dans le cœur normal de rats. Cependant, il reste à déterminer la ou les source(s) cellulaire(s) responsables de cette augmentation ainsi que le ou les stimuli menant à l'augmentation du NGF. Trois types cellulaires au niveau du cœur pourraient être responsables de la production du NGF soient les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules souches neuronales nestine positives. Il est bien établi que les cardiomyocytes synthétisent le NGF. De plus, la synthèse du NGF par les cardiomyocytes est augmentée par ces cellules suite à un dommage ischémique et à une surcharge de pression (Ieda M et al., 2004; Kimura K et al., 2007). L'expression du NGF au niveau des cardiomyocytes est bénéfique. En effet, une surexpression du NGF protège les cardiomyocytes contre l'apoptose induite par l'hypoxie/réoxygénation (Caporali A et al., 2008). Notre groupe ainsi que le groupe de Zhou avons démontré que les fibroblastes sont aussi une source de NGF (Drapeau J et al., 2005; Zhou S et al., 2004). Jusqu'à présent, il

reste à déterminer si les cellules souches neuronales nestine positives synthétisent le NGF. En parallèle, le ou les stimuli responsables de l'augmentation des niveaux de NGF suite au traitement avec la 6-OHDA ne sont pas examinés dans notre étude. Cependant au niveau du cerveau, il est connu que le traitement avec la 6-OHDA possède des effets apoptotiques en induisant un stress oxydant (Salinas M et al., 2003; Tanaka K et al., 2006; Jin F et al., 2008). En parallèle, il a été démontré que le NGF possède une action anti-apoptotique dans des conditions de stress oxydant. En effet, des études montrent que le NGF prévient l'accumulation des espèces réactives oxygénées dans les cellules de pheochromocytome PC12 exposées à la 6-OHDA. De plus, chez des animaux transgéniques surexprimant le NGF, la synthèse des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl2 ainsi que l'activité de certaines enzymes comme la superoxide dismutase et la glutathione transférase est augmentée (Salinas M et al., 2003; Liu H et al., 2003; Guégan C et al., 1999). Ces études nous permettent de spéculer que le traitement avec la 6-OHDA pourrait induire un stress oxydant au niveau du cœur menant à l'expression du NGF au niveau du myocarde. Il serait ainsi intéressant d'examiner si l'exposition des cellules cardiaques (cardiomyocytes et fibroblastes) et des cellules souches neuronales nestine positives au stress oxydant peut stimuler la synthèse du NGF.

Une récente publication par notre laboratoire suggère un troisième rôle probable pour les cellules souches neuronales nestine positives (Bégin PC et al., 2009). Nous démontrons, au niveau de la région infarctée et péri-infarctée de rats, de souris et d'humains, l'apparition de cardiomyocytes nestine positifs possédant un phénotype immature souligné par leur petite taille ainsi qu'une expression



désorganisée de la Cx43. La présence de cardiomyocytes nestine positifs n'est pas un phénomène transitoire puisqu'ils sont même détectés chez le rat 9 mois après un infarctus du myocarde. Chez l'homme, ces cellules sont détectées après une semaine ainsi qu'après 3 mois suite à un infarctus du myocarde dans la région infarctée et péri-infarctée. En parallèle, dans le cœur de rat normal et infarcté, une sous population de cellules souches neuronales nestine positives cardiaques exprimant deux marqueurs myogéniques soient Nkx2.5 et GATA4 ont été détectées. Ces deux facteurs transcriptionnels sont des régulateurs des gènes cardiaques et sont impliqués dans la différenciation des cellules progénitrices cardiaques en cardiomyocytes matures (Beltrami AP et al., 2003; Oka T et al., 2007). En plus, l'expression de GATA4 et de Nkx2.5 est maintenue au niveau des cardiomyocytes adultes. Ces facteurs jouent un rôle dans l'activation de gènes spécifiques aux cardiomyocytes adultes lors de l'hypertrophie cardiaque comme le facteur natriurétique de l'oreillette et la beta-MHC. Nos résultats sont analogues à ceux du groupe de Tomita qui démontre la présence de cellules coexprimant nestine et GATA4 au niveau du cœur. Ces cellules nestine/GATA4 positives injectées *in vivo* se différencient en cardiomyocytes (Tomita Y et al., 2005). Notre hypothèse est qu'une sous population de cellules souches neuronales nestine positives /Nkx2.5 positives /GATA4 positives pourrait être une source potentielle des cardiomyocytes nestine positifs. Nous avons aussi identifié des cellules nestine négatives qui sont Nkx2.5/GATA4 positives. Ces dernières peuvent représenter les populations de cellules progénitrices cardiaques c-kit positives et/ou *Stem cell antigen-1* positives qui ont la capacité de générer aussi des nouveaux cardiomyocytes (Beltrami AP et al., 2003; Oh H et al., 2003).

## **4. Interaction entre les différents événements cellulaires lors du remodelage cicatriciel**

La cicatrice cardiaque est un tissu vascularisé, innervé et peuplé aussi par des myofibroblastes et des cellules souches neuronales nestine positives cardiaques (Drapeau J et al., 2005; Frangogiannis NG et al., 2002; Sun Y et Weber KT, 2000; Vracko R et al., 1990). L'innervation sympathique d'un tissu endommagé est une réponse adaptative et joue un rôle actif dans une réparation tissulaire adéquate. D'ailleurs, une dénervation sympathique aboutit à un défaut au niveau de la formation de la cicatrice. L'innervation sympathique affecte le processus de cicatrisation en influençant l'inflammation, la réponse angiogénique et la prolifération des myofibroblastes. (Kim LR et al., 1998; Altun V et al., 2001; Kishimoto S et al., 1982). En effet, au niveau cutané, une interaction entre les fibres périphériques et les myofibroblastes a été démontrée. Un retard et/ou une atténuation de la cicatrisation est associé à la fois à une perturbation au niveau des myofibroblastes et à la dénervation du tissu (Liu M et al., 1999). De plus, il a été démontré que les fibres sympathiques participent à la formation de nouveaux vaisseaux en stimulant la synthèse du facteur angiogénique VEGF au niveau du tissu adipeux brun du rat (Asano A et al., 1997).

Dans la troisième étude de cette thèse, nous avons perturbé le processus de fibrose de réparation (amincissement de la cicatrice) dans le but d'examiner la contribution des différentes composantes cellulaires à la formation de la cicatrice cardiaque. Cette étude dévoile une interaction intéressante entre ces événements cellulaires. La cicatrisation inadéquate causée par le traitement avec DEX est à la fois

attribuée à une diminution de la prolifération des myofibroblastes et de la densité des fibres sympathiques. Nos données suggèrent que l'amincissement de la cicatrice cardiaque est en partie attribué à la diminution de la prolifération des myofibroblastes. En effet, nous avons montré que le traitement avec DEX cause une diminution dose dépendante de la prolifération des myofibroblastes cicatriciels cardiaques. Cependant, nous n'examinons pas les mécanismes impliqués dans l'effet anti-prolifératif du DEX. En parallèle, nous démontrons aussi que le traitement des animaux avec DEX cause une diminution significative des niveaux de l'ARNm du collagène. En effet, cette diminution des niveaux du collagène peut être associée à la diminution de la prolifération des myofibroblastes mais d'autres mécanismes peuvent y contribuer. Ainsi, il serait intéressant d'examiner le ou les mécanismes d'action par lesquels DEX diminue les niveaux du collagène ainsi que la prolifération des myofibroblastes. Dans la littérature, il a été démontré que le traitement avec DEX perturbe la réparation tissulaire en agissant sur le facteur profibrotique TGF-beta au niveau de différents types de fibroblastes. Par contre, l'effet du DEX sur la production du TGF-beta au niveau des myofibroblastes cicatriciels cardiaques est inconnu. Comme déjà mentionné, le TGF-beta joue un rôle dans la trans-différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, stimule la prolifération de ces derniers, l'expression de l'alpha-SMA au niveau de ces cellules ainsi que le dépôt accru de collagène (Cleutjens JP et al., 1995; Petrov VV et al., 2002; Bujak M et Frangogiannis NG, 2007). Il est bien établi que le traitement de fibroblastes provenant de la peau de rats foetaux et de fibroblastes dérivés du tissu granulaire de la peau avec DEX cause une diminution importante du TGF-beta et par conséquent,

une diminution de la synthèse du collagène (Meisler N et al., 1997; Cutroneo KR, 2002). De plus, cet effet inhibiteur du DEX sur le TGF-beta est aussi observé au niveau de fibroblastes normaux de rats provenant des reins et de la peau (Danielpour D et al., 1991). DEX bloque aussi la production du TGF-beta au niveau des fibroblastes pulmonaires humains en modulant les niveaux de l'ARNm de ce facteur ainsi qu'en diminuant c-Jun. C-Jun est un facteur de transcription qui fait partie du complexe nommé *activator protein-1*. Ce complexe est connu pour activer des gènes cibles pro-fibrotiques en ayant des sites de liaisons sur des régions régulatrices de la transcription de plusieurs gènes dont les métalloprotéinases matricielles, certains facteurs de croissance et protéines de la matrice extracellulaire (Wen FQ et al., 2002; Manabe I et al., 2002). Indépendamment du TGF-beta, DEX diminue la synthèse du collagène et cause une diminution dose dépendante de la synthèse des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases dans les fibroblastes humains provenant de la peau (Slavin J et al., 1994). De plus, il a été démontré au niveau des fibroblastes de rats dérivés de la peau que le promoteur du collagène possède des éléments de réponse pour les glucocorticoïdes permettant ainsi une action directe du DEX sur la synthèse du collagène (Meisler N et al., 1995). L'ensemble des données recueillies sur les fibroblastes provenant de la peau et du rein nous permettent de spéculer que DEX peut diminuer la synthèse du collagène ainsi que la prolifération des myofibroblastes en diminuant la synthèse du TGF-beta et par conséquent, la synthèse du collagène. De plus, DEX peut agir aussi de façon directe sur la transcription du gène du collagène.

Nos données démontrent qu'en plus de l'action anti-proliférative de DEX sur les myofibroblastes, DEX diminue la production du facteur neurotrophique NGF par ces cellules (Han BH et Holtzman DM, 2000; Zhou S et al., 2004; Emanuelli C et al., 2002). Par conséquent, les faibles niveaux de NGF contribuent à la diminution de la croissance des fibres sympathiques au niveau de la région infarctée. En parallèle, il a été démontré que les catécholamines ainsi que le NGF synthétisés par les fibres sympathiques stimulent la prolifération des myofibroblastes (Micera A et al., 2001; Manabe I et al., 2002). Ainsi, l'absence de fibres sympathiques dans la région infarctée des animaux traités avec DEX diminue la prolifération des myofibroblastes contribuant alors à l'amincissement de la cicatrice cardiaque.

L'atténuation de la densité des fibres sympathiques dans la région infarctée peut également être causée par l'absence de fibres nestine positives. Comme démontré dans la deuxième étude, les cellules souches nestine positives agissent comme un guide pour la croissance axonale. Une étude récente de notre équipe démontre que chez les animaux traités avec DEX, les cellules souches neuronales cardiaques perdent l'expression du filament nestine (El-Helou V et al., 2009) (voir annexe). Dans ce modèle, la perte des fibres nestine positives est associée à une diminution à la fois de l'ARNm ainsi que de la protéine de nestine. Ces résultats suggèrent que la perte des fibres nestine positives, en concert avec la diminution des niveaux de NGF, peut contribuer à la diminution de la densité des fibres sympathiques dans la région infarctée. Ainsi, l'atténuation de la réinnervation sympathique est causée à la fois par la diminution de la prolifération des myofibroblastes et de la synthèse du NGF ainsi que par la perte des fibres nestine

positives. Il est aussi probable que DEX agisse de façon directe sur les fibres sympathiques, un aspect non évalué dans notre étude. Dans la littérature, l'effet d'un traitement avec DEX sur la croissance axonale est controversé. Certaines études démontrent que le traitement avec DEX stimule la formation de neurites dans les cellules de neuroblastoma SH-SY5Y tandis que d'autres études montrent un effet inhibiteur au niveau des cellules PC12 (Federoff HJ et al., 1988; Costello B et al., 1990; Sheehan J et al., 2006). Cette disparité semble être attribuée à la dose de DEX utilisée et aussi, au type cellulaire étudié.

Dans la troisième étude présentée dans cette thèse, une association anatomique entre l'innervation sympathique et les vaisseaux est observée suggérant un rôle potentiel de ces fibres dans l'angiogenèse. En effet, suite à l'exposition au froid, les fibres sympathiques participent à la formation de nouveaux vaisseaux en stimulant la synthèse du facteur angiogénique VEGF au niveau du tissu adipeux brun du rat (Asano A et al., 1997). Avec le modèle DEX, il est difficile d'examiner l'effet direct d'une dénervation sympathique sur le nombre de vaisseaux présents dans la région infarctée car DEX a un effet direct sur la réponse angiogénique. En effet, DEX influence négativement la formation de vaisseaux au niveau des tumeurs et de la cicatrice cutanée en diminuant la synthèse de facteurs angiogéniques comme le VEGF et l'IL-8 (Zhang N et al., 2004; Yano A et al., 2006).

En conclusion, nos résultats suggèrent que suite à un infarctus du myocarde, la réinnervation sympathique de la cicatrice cardiaque est une réponse adaptative. Elle participe au remodelage cicatriciel en coordonnant l'angiogenèse et la prolifération des myofibroblastes.

## **5. Les cellules souches neuronales et la thérapie régénératrice**

Actuellement, la thérapie régénératrice par les cellules souches apporte énormément d'espoir au domaine cardiovasculaire. Cette branche prometteuse de la médecine est basée sur l'injection de cellules souches multipotentes suite à un dommage ischémique. Une grande variété de cellules souches est étudiée dans la littérature, les plus populaires étant les cellules dérivées de la moelle osseuse comme les cellules c-kit positives et les cellules progénitrices endothéliales (Beltrami AP et al., 2003; Yoon YS et al., 2005; Anversa P et al., 2006; Murry CE et al., 2006; Fazel S et al., 2006). Par contre, plusieurs obstacles sont rencontrés avec l'utilisation de ces cellules. Les cellules progénitrices endothéliales ont le potentiel de se différencier seulement en cellules endothéliales, elles sont alors incapables de fournir les cellules musculaires cardiaques et de reconstituer le tissu endommagé. Ainsi, pour améliorer leur effet bénéfique, la présence d'autres cellules souches capables de se différencier en cardiomyocytes est requise. Les cellules c-kit positives sont multipotentes et elles se différencient en cardiomyocytes ainsi qu'en cellules vasculaires (cellules endothéliales et musculaires lisses) régénérant ainsi une partie du myocarde endommagé. Par contre, plusieurs études démontrent que la réponse endogène de ces cellules dans la régénération du tissu endommagé n'est pas robuste. Pour optimiser alors la réponse, l'isolation de ces cellules ainsi que leur injection subséquente dans le cœur ou leur mobilisation directe à l'aide de facteurs chimioattractants à partir de la moelle osseuse est nécessaire (Orlic D et al., 2001a; Orlic D et al., 2001b). Certaines études démontrent que le rôle bénéfique pourrait aussi être associé

majoritairement à l'effet paracrine (contenu élevé en facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques) de ces cellules et à l'utilisation des facteurs chimioattractants qui sont favorables pour la survie des cardiomyocytes et la perfusion du tissu ischémique (Yoon YS et al., 2005; Fazel S et al., 2006). En conclusion, les cellules souches adultes multipotentes possèdent un potentiel cardiomyogénique néanmoins leur efficacité thérapeutique demeure controversée. Il semble que l'effet bénéfique est surtout observé suite à la mobilisation de ces cellules vers le cœur ou leur isolation à partir de sources extracardiaques suivi de leur injection dans le cœur.

Cependant, la présence d'une population endogène de cellules souches neuronales nestine positives dans le cœur adulte non endommagé représente un aspect intéressant. Ces cellules font partie intégrante de l'anatomie cardiaque et nos données suggèrent qu'elles jouent un rôle dans la réponse angiogénique, la réinnervation sympathique de la cicatrice et la formation de nouveaux cardiomyocytes suite à un dommage (El-Helou V et al., 2008; Beguin PC et al., 2009). Nous démontrons dans cette thèse que les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques sont recrutées vers la région infarctée, se différencient en cellules vasculaires et forment de nouveaux vaisseaux. De plus, ces cellules semblent être une source potentielle de nouveaux cardiomyocytes. Les cellules souches neuronales nestine positives en concert avec les myofibroblastes sont aussi impliquées dans la réinnervation sympathique de la région infarctée. Les fibres nestine positives projetées par ces cellules jouent un rôle de guide pour la croissance de nouvelles fibres sympathiques dans la région infarctée. En résumé, les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques possèdent un potentiel cardiomyogénique. Elles



contribuent au remodelage cicatriciel en favorisant la réponse angiogénique et la réinnervation sympathique au niveau de la région infarctée. Contrairement aux autres cellules souches décrites dans la littérature, la présence endogène des cellules souches neuronales nestine positives dans le cœur ainsi que leur distribution uniforme au niveau du myocarde pourraient favoriser une réponse rapide et efficace suite à un dommage.

## **Chapitre 6 CONCLUSION et PERSPECTIVES**

Les cellules souches neuronales nestine positives représentent une nouvelle population cellulaire faisant partie intégrante de l'anatomie du cœur. Lors du développement, ces cellules migrent à partir de la crête neurale vers le cœur et demeurent résidentes dans le myocarde adulte. Ces cellules ont été identifiées non seulement dans le cœur normal et endommagé de rats et de souris mais aussi au niveau des cœurs infarcis d'humains. Leur présence chez l'humain suite à un dommage a suscité l'intérêt d'évaluer le rôle biologique de ces cellules dans le remodelage ventriculaire. Suite à un infarctus du myocarde, une fibrose de réparation est déclenchée menant au remplacement du tissu endommagé par une cicatrice. La formation de cette cicatrice est une réponse adaptative requise pour conserver l'intégrité du myocarde. Elle est composée de myofibroblastes, de cellules vasculaires, de fibres sympathiques ainsi que de cellules souches neuronales nestine positives. Plusieurs groupes démontrent uniquement l'importance des myofibroblastes et de la réponse angiogénique dans le processus de cicatrisation. Les travaux présentés dans cette thèse sont les premiers à examiner l'importance de la contribution des deux autres composantes de la cicatrice dans le remodelage cicatriciel, soient les fibres sympathiques et les cellules souches neuronales nestine positives. Chez le rat, nous démontrons que les cellules souches neuronales nestine positives sont impliquées dans la réponse angiogénique et la réinnervation de la cicatrice par des fibres sympathiques. En effet, suite à l'injection de ces cellules dans la région non infarctée, elles migrent vers la région infarctée, se différencient en cellules vasculaires et forment des vaisseaux *de novo*. De plus, les fibres nestine positives des cellules souches neuronales cardiaques semblent jouer un rôle de guide

pour la croissance axonale des fibres sympathiques menant à la réinnervation sympathique de la cicatrice. D'autre part, il est connu qu'une perturbation au niveau de la prolifération des myofibroblastes et de la réponse angiogénique présente des effets délétères sur le remodelage cicatriciel menant à l'amincissement de la cicatrice et son éventuelle rupture. Nous démontrons qu'un traitement avec DEX engendre une cicatrisation maladaptative associée non seulement à la diminution de la prolifération des myofibroblastes mais aussi à une perte des fibres sympathiques.

L'ensemble des données présentées dans cette thèse souligne l'importance physiologique des cellules souches neuronales nestine positives suite au dommage ischémique. La présence endogène de ces cellules dans le cœur favorise leur recrutement rapide vers la région infarctée. Ainsi, l'identification des facteurs stimulant la prolifération et/ou la différenciation de ces cellules est primordiale et mérite une attention particulière. Finalement, nos résultats nous permettent de spéculer que les cellules souches neuronales nestine positives jouent un rôle central dans la fibrose de réparation et ce, en interagissant avec les différentes composantes de la cicatrice cardiaque.

Les études présentées dans cette thèse soulèvent plusieurs aspects qui doivent être évalués plus précisément. Premièrement, nous démontrons que les cellules souches neuronales nestine positives sont résidentes dans le myocarde normal. Lors de la réparation tissulaire, ces cellules souches neuronales nestine positives migrent vers la région infarctée, se différencient en cellules vasculaires et forment des vaisseaux *de novo*. En parallèle, nous observons aussi que dans la région infarctée, il y a une augmentation de l'expression du filament nestine. Jusqu'à présent, nous

ignorons si l'augmentation de l'expression de ce filament est essentielle pour la fonction biologique des cellules souches neuronales. Nous projetons alors des études supplémentaires afin de déterminer si l'expression de nestine est nécessaire pour la différenciation des cellules souches neuronales nestine positives en cellules vasculaires. Pour examiner cet aspect, nous utiliserons le modèle des rats diabétiques (type I ou II) où il est connu que la formation de la cicatrice est maladaptative. Ce défaut dans la cicatrisation est relié en partie à une perturbation du processus angiogénique (Schiekofer S et al., 2005). De façon intéressante, nous démontrons dans une récente publication que l'expression du filament nestine est absente dans les cellules souches neuronales cardiaques de rats diabétiques (El-Helou V et al., 2009) (voir annexe). Ainsi, l'ensemble de ces données nous pousse à examiner la conséquence biologique de la perte du filament nestine sur la différenciation de ces cellules souches neuronales en cellules vasculaires et la formation de vaisseaux *de novo*. Il nous est possible grâce à la technique d'infection par des lentivirus (contenant un shRNA de nestine) de bloquer l'expression de nestine au niveau des cellules souches neuronales. Par la suite, il sera intéressant d'injecter ces cellules dépourvues du filament nestine et d'observer si elles conservent leur capacité de former des nouveaux vaisseaux dans la région infarctée.

Deuxièmement, des études démontrent l'importance de la réponse angiogénique dans une cicatrisation adéquate (Barandon L al., 2003; Wang Y et al., 2004; Lindsey ML et al., 2002). Dans cette thèse, nous démontrons que les cellules souches neuronales nestine positives cardiaques possèdent des caractéristiques analogues aux cellules progénitrices de la peau SKPs. Les cellules souches

neuronales cardiaques et les SKPs sont toutes les deux dérivées de la crête neurale, expriment plusieurs marqueurs en commun et sont capables de se différencier en cellules neuronales, en cellules endothéliales et musculaires lisses ainsi qu'en cardiomyocytes. Il est alors possible d'utiliser les SKPs, une source autologue et accessible, en alternative aux cellules souches neuronales cardiaques afin d'augmenter la réponse angiogénique. Ces cellules seront isolées à partir de la peau de rats et injectées dans la région non-infarctée. Les effets de l'injection de ces cellules sur la formation de la cicatrice seront examinés.

Enfin, nous démontrons dans la troisième étude que le traitement avec DEX engendre un amincissement de la cicatrice. Ce processus est associé à une diminution de la densité des fibres sympathiques ainsi que de la prolifération des myofibroblastes et de la synthèse du facteur neurotrophique NGF. Par contre, cette étude n'examine pas le rôle direct des fibres sympathiques dans la formation de la cicatrice. Puisque des animaux knock-out pour les fibres sympathiques n'existent pas, nous avons décidé d'entreprendre une approche pharmacologique afin de dénervé le cœur. Nous prévoyons utiliser les animaux traités avec la 6-OHDA où les fibres sympathiques sont dégradées (voir chapitre 3). Suite au traitement avec la 6-OHDA, ces animaux subiront un infarctus du myocarde. Ce modèle permettra ainsi d'évaluer la conséquence de la perte des fibres sympathiques sur la formation de la cicatrice.

## BIBLIOGRAPHIE

Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7556-62.

Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* 2007 Apr;87(2):521-44.

Aigner L, Bogdahn U. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2008 Jan;331(1):225-41.

Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, Takeuchi T. Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest.* 2004 Dec;84(12):1581-92.

Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns.* 2001 Nov;27(7):717-22.

Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 7;101(36):13291-5.

Anderson DJ. Stem cells and transcription factors in the development of the mammalian neural crest. *FASEB J.* 1994 Jul;8(10):707-13.

Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 29;91(7):2795-9.

Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 2;47(9):1769-76.

Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res.* 1998 Jul 13;83(1):1-14.

A Anversa P, Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Cigola E, Olivetti G. Insulin-like growth factor-1 and myocyte growth: the danger of a dogma. Part I. Postnatal myocardial development: normal growth. *Cardiovasc Res.* 1996 Aug;32(2):219-25.

B Anversa P, Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Cigola E, Olivetti G. Insulin-like growth factor-1 and myocyte growth: the danger of a dogma part II. Induced myocardial growth: pathologic hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1996 Sep;32(3):484-95.

Arai A, Yamamoto K, Toyama J. Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation. *Dev Dyn*. 1997 Nov;210(3):344-53.

Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito M. Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J*. 1997 Nov 15;328 ( Pt 1):179-83.

Barandon L, Couffignal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P, Leroux L, Moreau C, Dare D, Dupl a C. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circulation*. 2003 Nov 4;108(18):2282-9.

Bashey RI, Donnelly M, Insinga F, Jimenez SA. Growth properties and biochemical characterization of collagens synthesized by adult rat heart fibroblasts in culture. *J Mol Cell Cardiol*. 1992 Jul;24(7):691-700.

Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2006 Jan;23(1):83-93.

Beguin PC, El-Helou V, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Villeneuve L, Rohlicek CV, Del Duca D, Lapointe N, Rouleau JL, Calderone A. The phenotype and potential origin of nestin(+) cardiac myocyte-like cells following infarction. *J Appl Physiol*. 2009 Aug 13.

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.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001 Jun 7;344(23):1750-7.

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol*. 1987 Dec;105(6 Pt 1):2621-9.

Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest*. 1997 Sep 15;100(6):1363-72.



Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 1972 Aug 25;43(2):429-35.

Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation.* 1997 Feb 4;95(3):684-92.

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1994 Nov;1(1):71-81.

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007 May 1;74(2):184-95.

Bulkley BH, Roberts WC. Steroid therapy during acute myocardial infarction. A cause of delayed healing and of ventricular aneurysm. *Am J Med.* 1974 Feb;56(2):244-50.

Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2005 Jan 1;65(1):40-51.

Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res.* 2004 Apr 2;94(6):828-35.

Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Jul;29(7):1947-58.

Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation.* 2000a Apr 25;101(16):1960-9.

Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, Ohara T, Lee MH, Tsai J, Lai WW, Karagueuzian HS, Wolf PL, Fishbein MC, Chen PS. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res.* 2000b Apr 14;86(7):816-21.

Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, Emanuelli C. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):299-311.

Cimini M, Fazel S, Zhuo S, Xaymardan M, Fujii H, Weisel RD, Li RK. c-kit dysfunction impairs myocardial healing after infarction. *Circulation.* 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I77-82.

- Cízková D, Soukup T, Mokry J. Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(5):338-47.
- Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport*. 1994 Oct 3;5(15):1885-8.
- Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*. 1995 Aug;147(2):325-38.
- Communal C, Colucci WS. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005 Mar;98(3):236-41.
- Costello B, Meymandi A, Freeman JA. Factors influencing GAP-43 gene expression in PC12 pheochromocytoma cells. *J Neurosci*. 1990 Apr;10(4):1398-406.
- Cutroneo KR. Relationship between glucocorticoid-mediated early decrease of protein synthesis and the steady state decreases of glucocorticoid receptor and TGF-beta activator protein. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Feb;34(2):194-203.
- Dahl D, Chi NH, Miles LE, Nguyen BT, Bignami A. Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells: fact or artifact? *J Histochem Cytochem*. 1982 Sep;30(9):912-8.
- Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res*. 1992 Oct 1;52(19):5334-41.
- Dai W, Hale SL, Kloner RA. Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction. *Transpl Immunol*. 2005 Dec;15(2):91-7. Epub 2005 Oct 4.
- Danielpour D, Kim KY, Winokur TS, Sporn MB. Differential regulation of the expression of transforming growth factor-beta s 1 and 2 by retinoic acid, epidermal growth factor, and dexamethasone in NRK-49F and A549 cells. *J Cell Physiol*. 1991 Aug;148(2):235-44.
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*. 1990 Jul;63(1):21-9.
- Delfino-Machín M, Chipperfield TR, Rodrigues FS, Kelsh RN. The proliferating field of neural crest stem cells. *Dev Dyn*. 2007 Dec;236(12):3242-54.
- Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats*. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 1;55(2):329-40.

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(1):103-11.

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):56-66.

Deten A, Hölzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Jun;33(6):1191-207.

Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibañez CF, Rafii S, Hempstead BL. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* 2000 Nov;127(21):4531-40.

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.

Eddy RJ, Petro JA, Tomasek JJ. Evidence for the nonmuscle nature of the "myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar. An immunofluorescence study. *Am J Pathol.* 1988 Feb;130(2):252-60.

Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifert S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambrone MA. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 1989 Jan;21(1):103-13.

El-Helou V, Proulx C, Béguin P, Assimakopoulos J, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L, Huot-Marchand JE, Deblois D, Lajoie C, Calderone A. The cardiac neural stem cell phenotype is compromised in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol.* 2009 Aug;220(2):440-9.

El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJ, Calderone A. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Nov;45(5):694-702.

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):1219-25.

Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation.* 2002 Oct 22;106(17):2257-62.

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005 Apr 1;66(1):22-32.

Farrell MJ, Kirby ML. Cell biology of cardiac development. *Int Rev Cytol.* 2001;202:99-158.

Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK. Cardioprotective c-kit<sup>+</sup> cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1865-77.

Federoff HJ, Grabczyk E, Fishman MC. Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1988 Dec 25;263(36):19290-5.

Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1082-93.

Fishman MC, Chien KR. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development.* 1997 Jun;124(11):2099-117.

Fitzsimonds RM, Poo MM. Retrograde signaling in the development and modification of synapses. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):143-70.

Fraccarollo D, Galuppo P, Bauersachs J, Ertl G. Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling. *Cardiovasc Res.* 2002 Jun;54(3):559-67.

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

Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res.* 2000 Oct;48(1):89-100.

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- $\alpha$ , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1998a Aug 18;98(7):699-710.

Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1998b Aug 18;98(7):687-98.

Frederiksen K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*. 1988 Apr;8(4):1144-51.

Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol*. 1995 Oct;131(2):453-64.

Fromaget C, el Aoumari A, Gros D. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*. 1992 Sep;51(1):9-20.

Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C, Kitamura S. Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Jan;24(1):67-72.

Gabbiani G. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res*. 1998 Jun;38(3):545-8.

Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med*. 1972 Apr 1;135(4):719-34.

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971 May 15;27(5):549-50.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1433-8.

Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11879-83.

Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO, Potts JD, Price RL, McFadden A, Rice M, Borg TK. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn*. 2004 Aug;230(4):787-94.

Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. *Nature*. 1990 Jul 19;346(6281):274-6.

Gourdie RG, Green CR, Severs NJ. Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J Cell Sci*. 1991 May;99 ( Pt 1):41-55.

Guégan C, Ceballos-Picot I, Chevalier E, Nicole A, Onténiente B, Sola B. Reduction of ischemic damage in NGF-transgenic mice: correlation with enhancement of antioxidant enzyme activities. *Neurobiol Dis.* 1999 Jun;6(3):180-9.

Gunning P, Ponte P, Blau H, Kedes L. alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. *Mol Cell Biol.* 1983 Nov;3(11):1985-95.

Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci.* 2000 Aug 1;20(15):5775-81.

Hasan W, Zhang R, Liu M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and alpha-smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res.* 2000 Apr;300(1):97-109.

Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M, Thompson WJ. Induction of neuregulin signaling in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci.* 2006 Jun 21;26(25):6873-84.

Heba G, Krzemiński T, Porc M, Grzyb J, Dembińska-Kieć A. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2001 Mar;52(1):39-52.

Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol.* 1995 Feb;146(2):419-28.

Hervé JC, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. *Pathol Biol (Paris).* 2008 Jul;56(5):334-41.

Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med.* 1971 Apr 1;133(4):885-900.

Hirschel BJ, Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Fibroblasts of granulation tissue: immunofluorescent staining with antismooth muscle serum. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1971 Nov;138(2):466-9.

Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 1985 Dec;5(12):3310-28.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jul 1;23(7):1185-9. Epub 2003 Apr 24.

Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Federoff HJ,

Ogawa S. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest.* 2004 Mar;113(6):876-84.

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* 2005 Jan;23(1):97-104.

Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol.* 1995 Jun;146(6):1325-31.

Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development.* 2000 Apr;127(8):1607-16.

Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008 Dec 14;600(1-3):78-82.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999 Jan 8;96(1):25-34.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation.* 2003 Sep 16;108(11):1395-403.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation.* 2003 Sep 16;108(11):1395-403.

Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem.* 1995 Aug;43(8):843-7.

Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8801-5.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 1996 Jan;74(1):86-107.

Kajstura J, Zhang X, Reiss K, Szoke E, Li P, Lagrasta C, Cheng W, Darzynkiewicz Z, Olivetti G, Anversa P. Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. *Circ Res.* 1994 Mar;74(3):383-400.

Kang H, Tian L, Son YJ, Zuo Y, Procaccino D, Love F, Hayworth C, Trachtenberg J, Mikesch M, Sutton L, Ponomareva O, Mignone J, Enikolopov G, Rimer M, Thompson W. Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci*. 2007 May 30;27(22):5948-57.

Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H. Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Exp Cell Res*. 2004 Apr 15;295(1):194-203.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen*. 1998 May-Jun;6(3):194-201.

Kimura K, Ieda M, Kanazawa H, Yagi T, Tsunoda M, Ninomiya S, Kurosawa H, Yoshimi K, Mochizuki H, Yamazaki K, Ogawa S, Fukuda K. Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2007 Jun 22;100(12):1755-64.

Kirby ML, Waldo KL. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res*. 1995 Aug;77(2):211-5.

Kirby ML, Waldo KL. Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation*. 1990 Aug;82(2):332-40.

Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*. 1983 Jun 3;220(4601):1059-61.

Kishimoto S, Maruo M, Ohse C, Yasuno H, Kimura H, Nagai T, Maeda T. The regeneration of the sympathetic catecholaminergic nerve fibers in the process of burn wound healing in guinea pigs. *J Invest Dermatol*. 1982 Sep;79(3):141-6.

Kronenberg G, Wang LP, Synowitz M, Gertz K, Katchanov J, Glass R, Harms C, Kempermann G, Kettenmann H, Endres M. Nestin-expressing cells divide and adopt a complex electrophysiologic phenotype after transient brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Dec;25(12):1613-24.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*. 1996 Dec 15;98(12):2854-65.



Kruithof BP, van den Hoff MJ, Wessels A, Moorman AF. Cardiac muscle cell formation after development of the linear heart tube. *Dev Dyn*. 2003a May;227(1):1-13.

Kruithof BP, Van Den Hoff MJ, Tesink-Taekema S, Moorman AF. Recruitment of intra- and extracardiac cells into the myocardial lineage during mouse development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003b Apr;271(2):303-14.

Lazarides E, Hubbard BD. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Dec;73(12):4344-8.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990 Feb 23;60(4):585-95.

Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7128-35.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.

Liem RK, Yen SH, Salomon GD, Shelanski ML. Intermediate filaments in nervous tissues. *J Cell Biol*. 1978 Dec;79(3):637-45.

Lie-Venema H, van den Akker NM, Bax NA, Winter EM, Maas S, Kekarainen T, Hoeben RC, deRuiter MC, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal*. 2007 Nov 12;7:1777-98.

Lin RC, Matesic DF, Marvin M, McKay RD, Brüstle O. Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis*. 1995 Apr;2(2):79-85.

Lindsey ML, Gannon J, Aikawa M, Schoen FJ, Rabkin E, Lopresti-Morrow L, Crawford J, Black S, Libby P, Mitchell PG, Lee RT. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Feb 12;105(6):753-8.

Liu M, Warn JD, Fan Q, Smith PG. Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell Tissue Res*. 1999 Sep;297(3):423-33.

Liu H, Nowak R, Chao W, Bloch KD. Nerve growth factor induces anti-apoptotic heme oxygenase-1 in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Neurochem*. 2003 Sep;86(6):1553-63.

Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000 Jul 25;102(4):470-9.

Lough J, Sugi Y. Endoderm and heart development. *Dev Dyn*. 2000 Apr;217(4):327-42.

Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Dec 17;325(3):943-51.

MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*. 2000 May;46(2):257-63.

Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science*. 1971 Aug 6;173(996):548-50.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):3-15.

Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2002 Dec 13;91(12):1103-13.

Matsuda H, Koyama H, Sato H, Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Matsumoto M, Konno K, Ushio H, Matsuda K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med*. 1998 Feb 2;187(3):297-306.

Meggs LG, Tillotson J, Huang H, Sonnenblick EH, Capasso JM, Anversa P. Noncoordinate regulation of alpha-1 adrenoreceptor coupling and reexpression of alpha skeletal actin in myocardial infarction-induced left ventricular failure in rats. *J Clin Invest*. 1990 Nov;86(5):1451-8.

Meisler N, Shull S, Xie R, Long GL, Absher M, Connolly JP, Cutroneo KR. Glucocorticoids coordinately regulate type I collagen pro alpha 1 promoter activity through both the glucocorticoid and transforming growth factor beta response elements: a novel mechanism of glucocorticoid regulation of eukaryotic genes. *J Cell Biochem*. 1995 Nov;59(3):376-88.

Meisler N, Keefer KA, Ehrlich HP, Yager DR, Myers-Parrelli J, Cutroneo KR. Dexamethasone abrogates the fibrogenic effect of transforming growth factor-beta in rat granuloma and granulation tissue fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1997 Mar;108(3):285-9.

Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):R577-95.

Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC Jr, 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-dependent mechanism. *Surgery*. 1998 Aug;124(2):291-6; discussion 297.

Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):704-9.

Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6162-7.

Mircoli L, Fedele L, Benetti M, Bolla GB, Radaelli A, Perlini S, Ferrari AU. Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. *Circulation*. 2002 Aug 13;106(7):866-72.

Misumi S, Kim TS, Jung CG, Masuda T, Urakawa S, Isobe Y, Furuyama F, Nishino H, Hida H. Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor beta1. *Eur J Neurosci*. 2008 Sep;28(6):1049-59.

Mokry J, Pudil R, Ehrmann J, Cizkova D, Osterreicher J, Filip S, Kolar Z. Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch*. 2008a Jul;453(1):33-41.

Mokry J, Ehrmann J, Karbanová J, Cizková D, Soukup T, Suchánek J, Filip S, Kolár Z. Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2008b;51(3):173-9.

Mokry J, Cizková D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev*. 2004 Dec;13(6):658-64.

Möllmann H, Nef HM, Kostin S, von Kalle C, Pilz I, Weber M, Schaper J, Hamm CW, Elsässer A. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc Res*. 2006 Sep 1;71(4):661-71.

Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*. 2003 Oct;83(4):1223-67.

Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 2003 Jul;89(7):806-14.

Morishita R, Ueda H, Ito H, Takasaki J, Nagata K, Asano T. Involvement of Gq/11 in both integrin signal-dependent and -independent pathways regulating endothelin-induced neural progenitor proliferation. *Neurosci Res.* 2007 Oct;59(2):205-14.

Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 2;47(9):1777-85.

Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 2003 Dec;51(12):1681-8.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004 Jun 25;94(12):1543-53.

Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res.* 2008 Mar;75(2):135-41.

Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol.* 2008 Jul 28;182(2):315-25.

Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 1999 Feb;29(2):520-7.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12313-8.

Oishi K, Kobayashi A, Fujii K, Kanehira D, Ito Y, Uchida MK. Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells. *J Pharmacol Sci.* 2004 Oct;96(2):208-18.

Oka T, Xu J, Molkentin JD. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Feb;18(1):117-31.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001a Aug 28;98(18):10344-9.

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.* 2001b Apr 5;410(6829):701-5.

Park SM, Jung JS, Jang MS, Kang KS, Kang SK. Transforming growth factor-beta1 regulates the fate of cultured spinal cord-derived neural progenitor cells. *Cell Prolif*. 2008 Apr;41(2):248-64.

Park DH, Eve DJ, Sanberg PR, Musso Iii J, Bachstetter AD, Wolfson A, Schlunk A, Baradez MO, Sinden JD, Bickford PC, Gemma C. Increased neuronal proliferation in the dentate gyrus of aged rats following neural stem cell implantation. *Stem Cells Dev*. 2009 Jul 1.

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2):258-63.

Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1975 Sep;56(3):740-50.

Poché RA, Furuta Y, Chaboissier MC, Schedl A, Behringer RR. Sox9 is expressed in mouse multipotent retinal progenitor cells and functions in Müller glial cell development. *J Comp Neurol*. 2008 Sep 20;510(3):237-50.

Poelmann RE, Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC. The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J*. 2002;29(4):255-61.

Poelmann RE, Mikawa T, Gittenberger-de Groot AC. Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: differentiation and apoptosis. *Dev Dyn*. 1998 Jul;212(3):373-84.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.

Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, Salman NJ, White F, Fillmore H, Bullock MR. Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):406-17.

Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation*. 1995 Oct 1;92(7):1891-901.

Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1976 Mar;53(3 Suppl):I204-6.

Rodgers KE, Xiong S, Steer R, diZerega GS. Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. *Stem Cells*. 2000;18(4):287-94.

Rosenthal N, Xavier-Neto J. From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):742-6.

Rossen RD, Swain JL, Michael LH, Weakley S, Giannini E, Entman ML. Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischemic canine heart muscle. A possible initiator of an extra myocardial mechanism of ischemic injury. *Circ Res.* 1985 Jul;57(1):119-30.

Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem.* 1995 Jun 7-21;147(1-2):29-34. Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, Eriksson JE. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem.* 2001 May 11;276(19):16456-63.

Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol.* 1996 Jun 15;176(2):230-42.

Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):13898-904.

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997 Jan 21;95(2):320-3.

Schiekofer S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Aug;25(8):1603-9.

Schlaepfer WW, Freeman LA. Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord. *J Cell Biol.* 1978 Sep;78(3):653-62.

Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development.* 1995 Dec;121(12):4203-14.

Scobioala S, Klocke R, Kuhlmann M, Tian W, Hasib L, Milting H, Koenig S, Stelljes M, El-Banayosy A, Tenderich G, Michel G, Breithardt G, Nikol S. Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J.* 2008 Apr;22(4):1021-31.

Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci.* 1993 Dec;106 ( Pt 4):1291-300.

Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 6;104(6):1865-70.

Sheehan J, Eischeid A, Saunders R, Pouratian N. Potentiation of neurite outgrowth and reduction of apoptosis by immunosuppressive agents: implications for neuronal injury and transplantation. *Neurosurg Focus.* 2006 May 15;20(5):E9.

Shi RZ, Wang JC, Huang SH, Wang XJ, Li QP. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2009 Jan 1;315(1):10-5.

Shin HY, Kim JH, Phi JH, Park CK, Kim JE, Kim JH, Paek SH, Wang KC, Kim DG. Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2008 Feb 1;86(2):356-67.

Sholter DE, Armstrong PW. Adverse effects of corticosteroids on the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* 2000 Apr;16(4):505-11.

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell.* 1997 Dec;1(1):25-34.

Simões-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, Yan CY, Davidson B, Xavier-Neto J. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol.* 2005 Jan 1;277(1):1-15.

Slavin J, Unemori E, Hunt TK, Amento E. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and dexamethasone have direct opposing effects on collagen metabolism in low passage human dermal fibroblasts in vitro. *Growth Factors.* 1994;11(3):205-13.

Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD. A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9881-90.

Steinert PM, Liem RK. Intermediate filament dynamics. *Cell.* 1990 Feb 23;60(4):521-3.

Stemple DL, Anderson DJ. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell.* 1992 Dec 11;71(6):973-85.

- Sun Y, Weber KT. 2000. Infarct scar: A dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 46:250–256.
- Sun Y, Weber KT. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res.* 1996a Apr;31(4):518-25.
- Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996b May;28(5):851-8.
- Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000 Jun 27;101(25):2981-8.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):215-62.
- Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1994 Sep;75(3):426-33.
- Tanaka K, Ogawa N, Asanuma M. Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. *Neurosci Lett.* 2006 Dec 20;410(2):85-9.
- Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells.* 2005 Jun-Jul;23(6):727-37.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):778-84.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.
- Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol.* 2005 Sep 26;170(7):1135-46.
- Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Rantanen J, Hurme T, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. *Am J Pathol.* 1999 Feb;154(2):591-600.



Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15;69(3):604-13.

Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. 1999 Jun 8;99(22):2934-41.

Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium. *Lab Invest*. 1990 Oct;63(4):490-501.

Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L. Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Apr;65(4):358-70.

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(16):5788-92.

Waldo K, Zdanowicz M, Burch J, Kumiski DH, Stadt HA, Godt RE, Creazzo TL, Kirby ML. A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(11):1499-507.

Waldo K, Miyagawa-Tomita S, Kumiski D, Kirby ML. Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: aortic sac to ventricular septal closure. *Dev Biol*. 1998 Apr 15;196(2):129-44.

Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 2001 Aug;128(16):3179-88.

Walker CA, Spinale FG. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Aug;118(2):375-82.

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 Nov;37(5):1041-52.

Wen FQ, Kohyama T, Sköld CM, Zhu YK, Liu X, Romberger DJ, Stoner J, Rennard SI. Glucocorticoids modulate TGF-beta production. *Inflammation*. 2002 Dec;26(6):279-90.

Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol*. 1994 Oct;145(4):868-75.

Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG, Toni N, D'Amour KA, Lie DC, Gage FH. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*. 2004 Jul 15;430(6997):350-6.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):199-210.

Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TG, Hochgreb T, Linhares VL. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis*. 2001 Nov;31(3):97-104.

Xu YJ, Chapman D, Dixon IM, Sethi R, Guo X, Dhalla NS. Differential gene expression in infarct scar and viable myocardium from rat heart following coronary ligation. *J Cell Mol Med*. 2004 Jan-Mar;8(1):85-92.

Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y, Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3003-9.

Yano T, Miura T, Ikeda Y, Matsuda E, Saito K, Miki T, Kobayashi H, Nishino Y, Ohtani S, Shimamoto K. Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovasc Pathol*. 2005 Sep-Oct;14(5):241-6.

Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Kobayashi N, Katakawa M, Yamamoto C, Tsunemi A, Suzuki R, Ueno T, Matsumoto K. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res*. 2007 Nov;30(11):1119-28.

Yen SH, Fields KL. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *J Cell Biol*. 1981 Jan;88(1):115-26.

Yin T, Ma X, Zhao L, Cheng K, Wang H. Angiotensin II promotes NO production, inhibits apoptosis and enhances adhesion potential of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Cell Res*. 2008 Jul;18(7):792-9.

Yoon YS, Lee N, Scadova H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol Cell*. 2005 Apr;97(4):253-63.

Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1 Pt 2):H250-8.

Zhang N, Fang Z, Contag PR, Purchio AF, West DB. Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood*. 2004 Jan 15;103(2):617-26.

Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, Miyauchi M, Kar S, Kangavari S, Fishbein MC, Sharifi B, Chen PS. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res*. 2004 Jul 9;95(1):76-83.

Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron*. 1994 Jan;12(1):11-24.

### **AUTRES**

Suivi des maladies du coeur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada, Statistique Canada, 2009. [www.phac-aspc.gc.ca](http://www.phac-aspc.gc.ca)

Marieb EN, 1993. Anatomie et physiologie humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc.

## **ANNEXE**

# The Cardiac Neural Stem Cell Phenotype Is Compromised in Streptozotocin-Induced Diabetic Cardiomyopathy

VIVIANE EL-HELOU,<sup>1,2</sup> CINDY PROULX,<sup>1,2</sup> PAULINE BÉGUIN,<sup>1</sup> JOHN ASSIMAKOPOULOS,<sup>1,2</sup> HUGUES GOSSELIN,<sup>2</sup> ROBERT CLEMENT,<sup>2</sup> LOUIS VILLENEUVE,<sup>2</sup> JULIE-ÉMILIE HUOT-MARCHAND,<sup>3</sup> DENIS DEBLOIS,<sup>3</sup> CLAUDE LAJOIE,<sup>4</sup> AND ANGELINO CALDERONE<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Montreal Heart Institute, Montreal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup>Département de Kinesiologie, Université de Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada

Neural stem cells were identified in the rat heart and during scar formation and healing participated in sympathetic fiber sprouting and angiogenesis. In the setting of diabetes, impaired wound healing represents a typical pathological feature. These findings provided the impetus to test the hypothesis that experimental diabetes adversely influenced the phenotype of cardiac neural stem cells. Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats were associated with elevated plasma glucose levels, significant loss of body weight and left ventricular contractile dysfunction. In the heart of STZ-diabetic rats, the density of nestin immunoreactive processes emanating from cardiac neural stem cells were reduced. The latter finding was reaffirmed as nestin protein expression was significantly decreased in the heart of STZ-diabetic rats and associated with a concomitant reduction of nestin mRNA. Employing the TUNEL assay, the loss of nestin expression in STZ-diabetic rats was not attributed to widespread cardiac neural stem cell apoptosis. Insulin administration to STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia led to a modest recovery of nestin protein expression in cardiac neural stem cells. By contrast, the administration of insulin immediately after STZ injection improved plasma glucose levels and significantly attenuated the loss of nestin protein expression. These data highlight the novel observation that nestin protein expression in cardiac neural stem cells was significantly reduced in STZ-induced type I diabetic rats. The aberrant cardiac neural stem cell phenotype may compromise their biological role and predispose the diabetic heart to maladaptive healing following ischemic injury.

J. Cell. Physiol. 220: 440–449, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

We recently reported the presence of nestin-expressing cells characterized by a small cell body and numerous processes intercalated among cardiac myocytes in the human, rat and mouse heart (El-Helou et al., 2008a). Employing the Wnt1-cre Z/EG transgenic mouse model, which expresses EGFP in embryologically derived neural crest cells, the reporter signal was detected in nestin-expressing cells, thereby supporting a neural crest origin (El-Helou et al., 2008a). Furthermore, rat and mouse neural crest-derived nestin-immunoreactive cells express the transcriptional factor *sox9* and display *in vivo* and *in vitro* characteristics consist of a neural stem cell population (El-Helou et al., 2008a). Following ischemic injury, cardiac neural stem cells were detected in the scar of the infarcted human and rat heart and additional studies performed in the rat confirmed their recruitment from the viable myocardium (El-Helou et al., 2005, 2008a). During reparative fibrosis, nestin<sup>(+)</sup> processes emanating from neural stem cells were detected physically associated with neurofilament-M immunoreactive fibers innervating the peri-infarct/infarct region (El-Helou et al., 2005, 2008a). This paradigm was analogous to the process of axonal sprouting reported in the denervated skeletal muscle thereby suggesting that neural stem cell processes may act as a guide and/or scaffold for sympathetic fiber sprouting of the infarct region following an ischemic insult (Hayworth et al., 2006; Kang et al., 2007). Biologically, sympathetic fiber innervation was identified as a seminal event of wound healing (Kishimoto et al., 1982; Carr et al., 1993; Kim et al., 1998). Consistent with this premise, impaired scar healing of the ischemically damaged heart following dexamethasone treatment was associated with

a significant reduction of neurofilament-M fibers innervating the peri-infarct/infarct region (El-Helou et al., 2008b). In addition to their postulated role in sympathetic fiber sprouting, a subpopulation of neural stem cells isolated from the infarct region was capable of differentiating to either a vascular smooth muscle or endothelial cell in the scar following their transplantation in the ischemically damaged rat heart (El-Helou et al., 2008a). This finding supports the premise that neural stem cells may further contribute to scar healing via their role as novel cellular substrates for *de novo* blood vessel formation.

Viviane El-Helou and Cindy Proulx contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: Heart and Stroke Foundation of Canada and Quebec.

Contract grant sponsor: Canadian Institutes of Health Research.

Contract grant sponsor: "La Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal".

Received 19 January 2009; Accepted 4 March 2009

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com.), 22 April 2009.  
DOI: 10.1002/jcp.21785

It has been established that hyperglycaemia and hyperinsulinemia increase the risk of death due to premature and accelerated coronary artery disease (Taegtmeyer et al., 2002). Furthermore, following acute myocardial infarction, diabetics have a higher mortality rate and an increased risk of progression to heart failure post-infarction (Beller, 2001). Greater infarct expansion may represent an underlying event for the poor prognosis, as scar size was reported larger in type I diabetic post-MI rats and associated with a higher number of apoptotic cardiac myocytes compared to non-diabetic post-MI rats (Shiomi et al., 2003). Furthermore, incomplete wound healing is a typical pathological feature of diabetes and related in part to impaired angiogenic and neurogenic responses (Polydefkis et al., 2004; Schiekofer et al., 2005). Thus, based on their reported angiogenic and neurogenic roles during reparative fibrosis, scar formation and healing could be likewise impaired in the diabetic heart if the resident neural stem cell population was adversely influenced. Thus, the present study tested the hypothesis that the cardiac neural stem cell phenotype was compromised in an experimental rat model of type I diabetes.

## Methods

### Streptozotocin model of type I diabetes and insulin therapy, dexamethasone-induced hyperglycaemia, and Zucker diabetic fatty rats

A single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 60 mg/kg) was administered to adult male Sprague–Dawley rats (9–11 weeks old; Charles Rivers, Canada). Long-acting human insulin (3 U/kg; Novo Nordisk, Mississauga, Canada) was injected twice daily at 12 h intervals for a period of 2 weeks in normal and 3-week STZ-rats with established hyperglycaemia. In a separate study, insulin was administered immediately after the injection of STZ and continued for 7 days (twice daily at 12 h intervals). STZ-diabetic rats treated with insulin were sacrificed ~8 h after the last injection. In the 2-week insulin therapy study, three to four rats from each group were used for immunofluorescence and neither heart weight nor ventricular function was recorded. Dexamethasone (0.1 mg/kg) was added to normal rat chow for a period of 6 days and the dosage was adjusted every 2 days according to changes in body weight. In this study, two rats from sham and dexamethasone-treated groups were used for immunofluorescence and neither heart weight nor ventricular function was recorded. Left ventricular contractility was assessed by a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2F, Millar Instrument, Houston, TX), as previously described (El-Helou et al., 2005) and data analyzed with the program IOX version 1.8.9 (Emka Technologies; Falls Church, VA) (El-Helou et al., 2008b). Six-week old Zucker diabetic fatty (ZDF) rats and their lean wild types were obtained from Genetic Models (Gmi™, Indianapolis, IN) and sacrificed 8–9 weeks later. Plasma glucose concentration was measured with a glucometer (Bayer; Model Ascensia Elite XL) from blood samples obtained from the tail vein ~8 h after fasting. Plasma insulin levels in lean wild type and ZDF-diabetic rats were measured by radioimmunoassay (Linco research, St. Charles, MO) in blood samples collected in heparinized glass tubes. At the end of each experimental protocol, the heart was removed and the left ventricular free wall (not including septum) and right ventricle were immediately weighed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In the ZDF study, left ventricular weight includes the septum. 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

Real-time PCR was performed by standard methodology on total RNA isolated from the left ventricle as previously described (El-Helou et al., 2005). In some experiments, the left ventricle was divided in two and a sample used for real-time PCR and the other

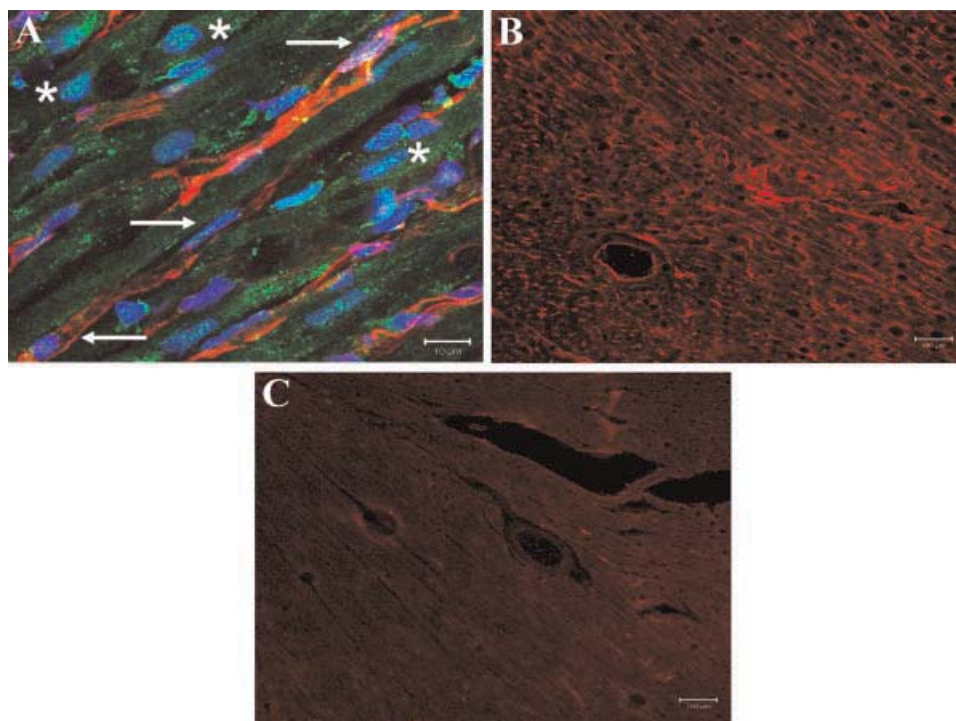
for Western blot analysis (please see below). Real-time PCR was performed according to the manufacturer's instructions employing the molecule SYBR Green (Applied BioSystems, Foster City, CA). Primers for each gene were obtained from distinct exons that span an intron employing the program Ensembl Genome Browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). The sequence specificity of each primer was verified with the program Blast derived from the National Centre for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The primers used were the following, rat atrial natriuretic peptide (ANP); forward 5'-AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3' and reverse 5'-ATTTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'; rat nestin forward 5'-TGCAGGCCACTGATAAGTTCCA-3' and reverse 5'-TTCCTGCTCCAGGGCTTCCA-3'; rat sox9 forward; 5'-AGGAAGCTGGCAGACCAGTACC-3' and reverse 5'-TCTCTTCTCGCTCTCGTTCA-3'; rat  $\beta$ -actin forward 5'-CCCTA-AGCCAACCGTGAA-3' and reverse 5'-GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'. mRNA levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA.

### Immunofluorescence

The heart was excised, immersed directly in 2-methyl butane (temperature maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$ ), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Immunofluorescence on cardiac tissue (cryostat sections of 14  $\mu\text{m}$  thickness) was performed as previously described (El-Helou et al., 2005). Antibodies employed include the mouse monoclonal anti-nestin (1:500; Chemicon, Temecula, CA) and the rabbit polyclonal anti-sox9 (1:200; Abcam, Cambridge, MA). The nucleus was identified with to-pro<sup>3</sup> (InVitrogen, Ontario, Canada; 1.5  $\mu\text{M}$ ; emission wavelength, 661 nm) staining. Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated to conjugated to Alexa-546 (1:500; InVitrogen; emission wavelength, 570 nm) and a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 (1:500; InVitrogen; emission wavelength, 520 nm). Non-specific staining was determined following the addition of an isotype control antibody or the conjugated secondary antibody alone. Immunofluorescence was visualized either with a 10X- or 63X-oil 1.4 NA DIC plan apochromat objective mounted on a Zeiss Axiocvert, Germany, 100 M confocal microscope. Figures 1A and 7 represent projections (LSM 510 software; Zeiss) derived from a z-stack (voxel size of 143 nm  $\times$  143 nm  $\times$  250 nm in XYZ) of a 14  $\mu\text{m}$  cryostat tissue section. The Z-stack image was deconvolved (Huygens Professional 3.0; SVI, Netherlands) and the final image reconstructed with the LSM 510 software. A semi-quantitative measure of nestin immunoreactive processes ( $\mu\text{m}^2$ ) emanating from neural stem cells in the heart of normal ( $n = 3$ ), 5-week STZ ( $n = 3$ ), and insulin-treated STZ rats ( $n = 3$ ) was assessed at low magnification in at least five distinct fields per tissue slice (2–3 tissue slices per rat were examined). Prior to analysis (LSM 510 software; Zeiss), each image was deconvolved (Huygens Professional 3.0; SVI, Netherlands) to remove background noise. Nestin staining ( $\mu\text{m}^2$ ) was normalized to the surface area ( $\mu\text{m}^2$ ) and the data depicted as a percentage.

The TUNEL assay was performed on cardiac cryostat tissue sections (14  $\mu\text{m}$  thickness), initially fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and subsequently permeabilized with saponin solution (0.075% saponin/1 mM EGTA). Fragmented DNA was labeled with biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (Roche Diagnostics, Laval, Canada) via the action of terminal deoxynucleotidyl transferase (InVitrogen). Tissue sections were then treated for 1 h with extrAvidin-fluorescein isothiocyanate (Sigma–Aldrich, Ontario, Canada; 4  $\mu\text{l}$  per 200 ml of staining solution containing 500 mg of dry skim milk, 0.1% Triton X-100 in 10 ml of SSC 4 $\times$ ). In parallel, nestin immunoreactivity and nuclear staining were performed as described above. Positive TUNEL staining was determined by treating tissue sections with DNase I (1U/ $\mu\text{l}$ ), whereas the negative control experiment omitted the addition of terminal deoxynucleotidyl transferase.

To-pro<sup>3</sup> staining of the nucleus was indirectly used to assess total cell number. At least 8–10 fields of each cryostat tissue section



**Fig. 1.** The cardiac neural stem cell phenotype in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Part A:** In the normal rat heart, neural stem cells (indicated by arrow) were detected intercalated among cardiac myocytes characterized by nestin (red fluorescence) immunoreactive processes and a variable punctate pattern of sox9 (green fluorescence) staining predominantly in the nucleus. Furthermore, nuclear sox9 staining was also observed in nestin-negative cardiac myocytes (indicated by asterisk). The nucleus was identified with to-pro<sup>3</sup> staining (blue fluorescence). **Part B:** In the normal rat heart, nestin-immunoreactive neural stem cells were detected throughout the myocardium intercalated among nestin-negative cardiac myocytes. The density ( $\mu\text{m}^2$ ) of nestin-immunoreactive processes emanating from neural stem cells normalized to the surface area ( $\mu\text{m}^2$ ) of the normal rat heart was  $6.3 \pm 0.7\%$  ( $n = 3$ ). **Part C:** In the left ventricle of 5-week streptozotocin (STZ)-diabetic rats, nestin-immunoreactive neural stem cells were less abundant and the density ( $0.36 \pm 0.14\%$ ;  $n = 3$ ) significantly ( $P < 0.001$ ) reduced as compared to normal rats.

(3–4 tissue slices per rat) was examined, cell number quantified with the program LSM 5 Image Browser (Zeiss) and normalized to the surface area ( $\text{mm}^2$ ).

#### Western blot

The left ventricle was lysed in a buffer containing 10 mM TRIS (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% triton X-100, 0.5% nonidet P-40, and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of leupeptin and aprotinin. The

homogenate was centrifuged for 10 min, the supernatant frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The BioRad assay was used to determine protein content. The lysate (100  $\mu\text{g}$ ) was subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis, and protein was subsequently transferred to a PVDF membrane (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). Immunoblotting was performed as previously described (El-Helou et al., 2005). Antibodies used were the mouse monoclonal anti-nestin (1:1,000; Chemicon); rabbit polyclonal anti-sox9 (1:1,000; Abcam) and a mouse monoclonal anti-GAPDH (1:10,000; Ambion, Austin, TX). The secondary

**TABLE 1.** Body weight, heart weight, and plasma glucose level of 3-week STZ-induced diabetic rats

	BW (g)	LV (mg)	LV/BW (mg/g)	RV (mg)	RV/BW (mg/g)	Plasma Glucose (mM)
Sham ( $n = 6$ )	$359 \pm 12$	$500 \pm 19$	$1.41 \pm 0.06$	$181 \pm 9$	$0.51 \pm 0.02$	$6 \pm 0.4$
STZ ( $n = 6$ )	$234 \pm 23^a$	$326 \pm 39^a$	$1.39 \pm 0.10$	$116 \pm 10^a$	$0.51 \pm 0.05$	$28 \pm 2^a$

STZ indicates streptozotocin-induced diabetic rats; BW, body weight; LV, left ventricle and RV, right ventricle. Data are presented as mean  $\pm$  SEM, analyzed by an unpaired t-test, (a) represents  $P < 0.05$  versus sham and (n) number of rats examined.

**TABLE 2.** Ventricular function of 3-week STZ-induced diabetic rats

	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	LV + dP/dt (mmHg/sec)	LV - dP/dt (mmHg/sec)
Sham ( $n = 6$ )	$130 \pm 8$	$148 \pm 10$	$10 \pm 2$	$7,044 \pm 205$	$5,711 \pm 314$
STZ ( $n = 6$ )	$82 \pm 5^a$	$103 \pm 2^a$	$9 \pm 1$	$5,782 \pm 148^a$	$4,042 \pm 110^a$

STZ indicates streptozotocin-induced diabetic rats; MAP, 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  $\pm$  SEM, analyzed by an unpaired t-test, (a) represents  $P < 0.05$  versus sham and (n) number of rats examined.

TABLE 3. Body weight, heart weight, and plasma glucose level of 5-week STZ-induced diabetic rats and the effect of insulin

	BW (g)	LV (mg)	LV/BW (mg/g)	RV (mg)	RV/BW (mg/g)	Plasma glucose (mM)
Sham (n = 8)	401 ± 25	591 ± 28	1.48 ± 0.05	186 ± 13	0.46 ± 0.02	7 ± 0.8
INS (n = 8)	429 ± 11	587 ± 24	1.37 ± 0.04	190 ± 8	0.44 ± 0.02	6 ± 0.8
STZ (n = 9)	254 ± 8 <sup>a</sup>	362 ± 20 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.05	128 ± 6 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.02	25 ± 1 <sup>a</sup>
INS + STZ (n = 8)	318 ± 11 <sup>a,b</sup>	407 ± 27 <sup>a,b</sup>	1.28 ± 0.08	152 ± 6 <sup>a,b</sup>	0.48 ± 0.02	28 ± 1 <sup>a</sup>

INS indicates sham rats treated with insulin; STZ, streptozotocin-induced diabetic rats; BW, body weight; LV, left ventricle and RV, right ventricle. Data are presented as mean ± SEM, analyzed by a two-way ANOVA. (a) represents  $P < 0.05$  versus sham and/or INS group, (b)  $P < 0.05$  versus STZ group, and (n) number of rats examined.

antibody used was either a goat anti-mouse or goat anti-rabbit conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The immunoreactive protein signal was visualized by an ECL detection kit (Perkin Elmer). Films were scanned with a laser densitometer utilizing the program Quantity One (BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) and the data depicted as arbitrary light units normalized to GAPDH protein expression.

### Statistics

Data were presented as the mean ± SEM, and (n) represents the number of rats used per experiment. Morphological, hemodynamic, immunofluorescent, protein and gene expression data were evaluated by a one-way (GraphPad Prism, San Diego, CA) or two-way ANOVA (STATISTICA; StatSoft, Tulsa, OK), a significant difference was determined by the Neuman–Keuls post hoc test and  $P < 0.05$  was considered statistically significant. In the dexamethasone and ZDF study, all parameters were assessed by a Student's unpaired *t*-test and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

#### Heart weight, body weight, left ventricular function and cardiac remodeling in STZ-diabetic rats

Three and 5 weeks after streptozotocin (STZ) injection, plasma glucose levels were significantly increased and associated with a decline of body weight gain (Tables 1 and 3). Absolute left and right ventricular weights were significantly reduced in STZ-diabetic rats (Tables 1 and 3). Furthermore, mean arterial pressure, left ventricular systolic and diastolic function were depressed in STZ-diabetic rats (Tables 2 and 4). In the left ventricle of 5 week-STZ rats, ANP mRNA levels were significantly ( $P < 0.01$  vs. sham) increased ( $22 \pm 7$ ;  $n = 8$ ) compared to non-diabetic rats ( $2.3 \pm 0.2$ ;  $n = 6$ ).

#### Nestin protein and mRNA expression in STZ-diabetic rats

In the normal rat heart, nestin-expressing neural stem cells were detected intercalated among cardiac myocytes and associated with a punctate pattern of sox9 immunoreactivity predominantly in the nucleus and of variable intensity (Fig. 1). Sox9 staining was also detected in the nucleus of nestin-negative cardiac myocytes (Fig. 1). In the myocardium of 3- and 5-week STZ-diabetic rats, an immunofluorescence approach revealed that nestin-immunoreactive processes emanating from neural stem cells were markedly reduced (Fig. 1). A semi-quantitative

assessment of the immunofluorescence signal confirmed a significant loss ( $P < 0.001$  vs. sham) in the density of nestin staining in the heart of 5-week STZ-diabetic rats ( $0.36 \pm 0.14\%$ ), compared to non-diabetic rats ( $6.3 \pm 0.7\%$ ). These findings were reaffirmed by Western blot analysis as nestin protein content in the left ventricle was significantly ( $P < 0.01$  vs. sham) reduced (3 weeks, Sham =  $2.48 \pm 0.41$  vs. STZ =  $0.67 \pm 0.04$ ; 5 weeks, Sham =  $2.55 \pm 0.26$  vs. STZ =  $0.36 \pm 0.12$ ;  $n = 4$  for each group) in 3- and 5-week STZ-diabetic rats (Fig. 2). Furthermore, in 5-week STZ-diabetic rats, the decrease in protein content was associated with a significant downregulation of nestin mRNA (Fig. 2). By contrast, sox9 mRNA levels in 5 week STZ-diabetic rats ( $1.6 \pm 0.3$ ;  $n = 4$ ) were similar to non-diabetic rats ( $1.1 \pm 0.1$ ;  $n = 4$ ).

#### The loss of nestin expression in STZ-diabetic rats was not attributed to widespread neural stem cell apoptosis

To explore whether cardiac neural stem cell apoptosis may have contributed in part to the loss of nestin protein expression, diabetic rats were examined 3 and 7 days following STZ injection. Three days following STZ administration, plasma glucose levels were elevated ( $26 \pm 1$  mM;  $P < 0.05$  vs. sham;  $n = 5$ ) and associated with a significant loss of nestin mRNA expression in the left ventricle whereas nestin protein levels were not statistically decreased (Fig. 3). In 7-day STZ-diabetic rats (plasma glucose;  $28 \pm 3$  mM;  $P < 0.05$  vs. sham;  $n = 5$ ), nestin protein and mRNA levels were both significantly decreased (Fig. 3). The rapid decrease of nestin protein and mRNA expression was not associated with a concomitant loss of sox9 protein or mRNA (Fig. 3). Employing the TUNEL assay, cardiac myocyte apoptosis was not observed in the left ventricle of diabetic rats at either 3 ( $n = 2$ ) or 7 ( $n = 2$ ) days after STZ injection (Fig. 4). Furthermore, widespread apoptosis of cardiac neural stem cells was not evident as one to two cells were identified as apoptotic in the myocardium of STZ-diabetic rats (Fig. 4). The lack of an apoptotic response in the heart of STZ-diabetic rats was reaffirmed as the total number of cells identified in the left ventricle by to-pro<sup>3</sup> staining of the nucleus was equivalent between sham ( $1,857 \pm 92$  cells/mm<sup>2</sup>;  $n = 2$ ) and STZ-diabetic rats (3 days,  $2,165 \pm 30$ ; 7 days,  $2,167 \pm 108$  cells/mm<sup>2</sup>;  $n = 2$  for each group).

#### The effect of insulin therapy on heart weight, body weight, left ventricular function and cardiac remodeling in STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia

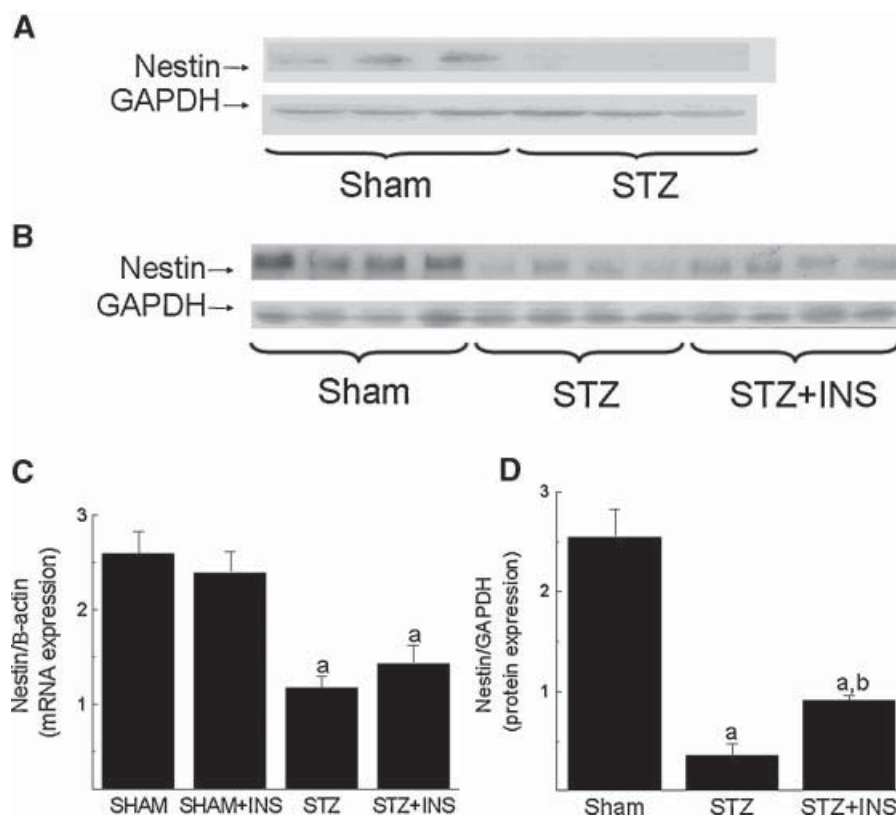
In normal rats, insulin administration led to a modest hypoglycaemic effect 2 h post-injection ( $3.4 \pm 0.9$  mM;  $P < 0.05$

TABLE 4. Ventricular function of 5-week STZ-induced diabetic rats and the effect of insulin

	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	LV + dP/dt (mmHg/sec)	LV - dP/dt (mmHg/sec)
Sham (n = 8)	122 ± 7	146 ± 10	9 ± 1	6,977 ± 257	6,125 ± 333
INS (n = 8)	126 ± 5	134 ± 10	9 ± 1	6,906 ± 386	5,760 ± 440
STZ (n = 9)	94 ± 4 <sup>a</sup>	102 ± 2 <sup>a</sup>	7 ± 1	5,776 ± 203 <sup>a</sup>	3,791 ± 165 <sup>a</sup>
INS + STZ (n = 8)	96 ± 5 <sup>a</sup>	101 ± 4 <sup>a</sup>	10 ± 1	5,892 ± 195 <sup>a</sup>	3,984 ± 251 <sup>a</sup>

INS indicates sham rats treated with insulin; STZ, streptozotocin-induced diabetic rats; MAP, 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 ± SEM, analyzed by a two-way ANOVA. (a) represents  $P < 0.05$  versus sham and/or INS group, and (n) number of rats examined. In insulin-treated STZ rats, hemodynamic measurements were taken 6–12 h post-injection.





**Fig. 2.** Nestin protein and mRNA expression in the left ventricle of 3- and 5-week streptozotocin-diabetic rats and the effect of insulin. Nestin protein levels were significantly reduced in (Part A) 3-week ( $n = 4$ ) and (Part B) 5-week streptozotocin (STZ) diabetic rats ( $n = 4$ ). Part B: Insulin (INS) administration to 3-week STZ-diabetic rats for a period of 2 weeks partially restored nestin protein expression ( $n = 4$ ). GAPDH protein expression was unchanged in STZ-diabetic rats. Part C: Nestin mRNA levels were significantly reduced in STZ-diabetic rats ( $n = 8$ ). INS administration to sham rats ( $n = 6$ ) had no effect on nestin mRNA and expression remained decreased following treatment of STZ-diabetic rats ( $n = 5$ ). Part D: Semi-quantitative assessment of nestin protein content revealed a decreased expression in STZ-diabetic rats ( $n = 4$ ) and a partial significant recovery was observed following INS administration ( $n = 4$ ). (a) Denotes  $P < 0.05$  versus sham and (b) denotes  $P < 0.05$  versus untreated STZ-diabetic rats. Data was evaluated by either a one-way or two-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman–Keuls post hoc test.

vs. 12 h post-injection;  $n = 6$ ) and returned to normal 12 h later ( $6.4 \pm 0.8$  mM). Furthermore, insulin treatment of normal rats for a period of 2 weeks had no effect on body weight (Table 3) or left ventricular contractility (Table 4). In STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia, insulin administration led to a transient normalization of plasma glucose 2 h after injection ( $10 \pm 1.7$  mM;  $n = 8$ ;  $P < 0.05$  vs. untreated STZ), remained significantly decreased 4 h post-injection ( $17 \pm 1.5$  mM;  $n = 8$ ;  $P < 0.05$  vs. untreated STZ) and returned to the pre-injection hyperglycaemic level 12 h later ( $27 \pm 1.8$  mM;  $n = 8$ ). Despite the transient effect on plasma glucose levels, insulin treatment partially reversed the loss of body and heart weights in STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia (Table 3), whereas left ventricular dysfunction persisted (Table 4). Insulin treatment of sham rats did not influence ventricular ANP mRNA expression ( $1.9 \pm 0.6$ ;  $n = 6$ ). However, elevated ANP mRNA expression in the left ventricle of STZ-diabetic rats ( $22 \pm 7$ ;  $n = 8$ ) was normalized following insulin therapy ( $2.4 \pm 0.9$ ;  $n = 5$ ;  $P < 0.01$  vs. untreated STZ-diabetic rats).

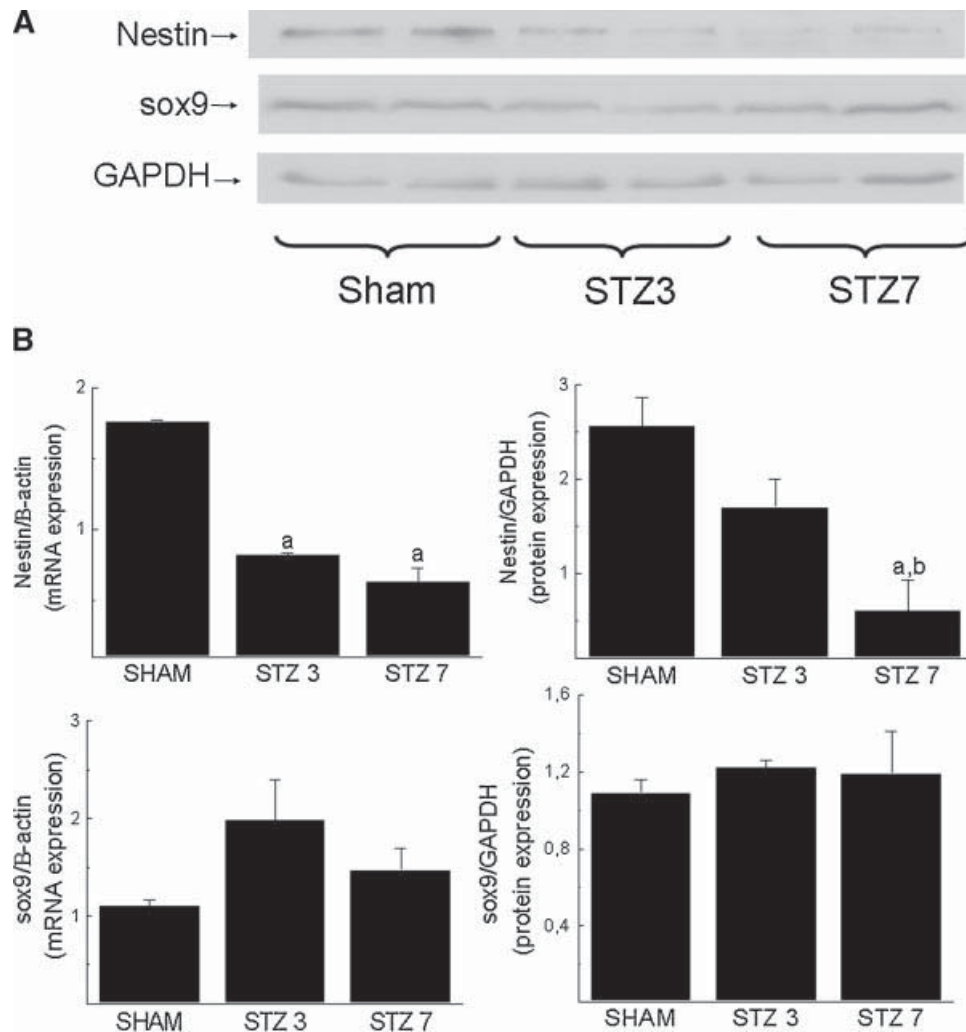
#### Insulin therapy and nestin expression in the heart of STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia

In insulin treated sham rats, nestin mRNA expression was similar to sham rats (Fig. 2). In the left ventricle of 3-week

STZ-diabetic rats treated with insulin for 2 weeks, a modest reappearance of neural stem cells was apparent as reflected by the partial recovery of nestin-immunoreactive processes ( $1.1 \pm 0.21\%$ ), but remained significantly lower ( $P < 0.001$  vs. sham) compared to non-diabetic rats ( $6.3 \pm 0.7\%$ ). The immunofluorescent data was reaffirmed by a Western blot analysis as a modest significant recovery of nestin protein expression was observed in insulin-treated STZ-diabetic rats (Fig. 2). In 3-week STZ-diabetic rats treated with insulin for a period of 2 weeks, nestin mRNA levels were modestly increased compared to non-treated STZ-diabetic rats but did not reach statistical significance (Fig. 2).

#### Insulin administration immediately after STZ injection reduced plasma glucose levels and attenuated the loss of nestin protein expression

The modest beneficial effect of insulin therapy in STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia provided the impetus to test the hypothesis that insulin administration immediately after STZ injection would significantly attenuate and/or prevent the loss of nestin expression in cardiac neural stem cells. In 7-day untreated STZ-diabetic rats ( $n = 5$ ), body weight (sham =  $325 \pm 4$  vs. STZ =  $281 \pm 5$  g;  $P < 0.05$  vs. sham) was significantly decreased whereas plasma glucose levels



**Fig. 3.** Nestin and sox9 protein and mRNA expression in the left ventricle of 3- and 7-day streptozotocin-diabetic rats. **Part A:** A temporal decrease of nestin protein expression in the left ventricle 3- and 7-days after streptozotocin (STZ) injection ( $n = 3$  for each time point). Sox9 and GAPDH proteins levels in STZ-diabetic rats were similar to non-diabetic sham rats. **Part B:** Semi-quantitative assessment of nestin and sox9 protein and mRNA expression 3 and 7 days after STZ injection ( $n = 3$  for each time point). (a) Denotes  $P < 0.05$  versus sham and (b) denotes  $P < 0.05$  versus 3-day STZ-diabetic rat, data was evaluated by a one-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman–Keuls post hoc test.

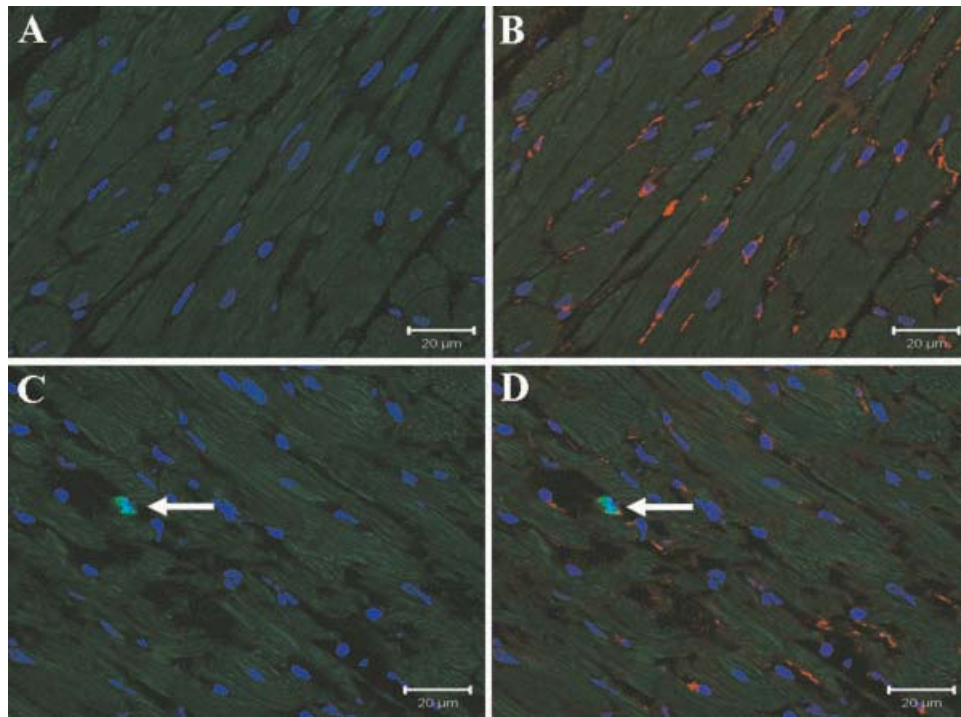
(sham =  $7 \pm 0.2$  vs. STZ =  $29 \pm 2$  mM;  $P < 0.05$  vs. sham) were higher compared to sham rats ( $n = 5$ ). Furthermore, nestin protein expression was significantly decreased in 7-day untreated STZ-diabetic rats compared to sham rats (Fig. 5). Insulin administration immediately after STZ injection and continued for 7 days did not prevent body weight loss (STZ + insulin =  $289 \pm 8$ ;  $n = 4$ ) but lowered plasma glucose levels (STZ + insulin =  $15 \pm 4$ ;  $n = 4$ ;  $P < 0.05$  vs. sham and STZ). Insulin therapy significantly attenuated the loss of nestin protein expression in STZ-diabetic rats and was casually related to the reduction of plasma glucose levels (Fig. 5).

#### Nestin protein expression in the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat model of type II diabetes and dexamethasone-induced hyperglycaemia

Obesity, hyperglycaemia and hyperinsulinemia were evident in ZDF rats as compared to lean wild type rats (Table 5). Furthermore, plasma glucose levels in ZDF rats were comparable to that observed in STZ-diabetic rats. In the left

ventricle of ZDF rats, nestin protein and mRNA expression were significantly reduced (Fig. 6). However, the loss of nestin protein (73%  $\downarrow$  vs. lean rats) was disproportionately greater than the reduction of mRNA expression (35%  $\downarrow$  vs. lean rats).

Adult male Sprague–Dawley rats treated with dexamethasone for a period of 6 days were associated with a significant reduction of body weight (sham =  $313 \pm 8$  vs. dexamethasone =  $228 \pm 4$  g;  $n = 6$  for each group;  $P < 0.05$  vs. sham). Plasma glucose levels were modestly increased 2 days following dexamethasone injection (Sham =  $6 \pm 0.3$  vs. DEX =  $9 \pm 0.8$  mM;  $n = 4$  for each group) and significantly elevated 4 ( $15 \pm 1$  mM;  $n = 4$ ;  $P < 0.05$  vs. sham) and 6 ( $22 \pm 2$  mM;  $n = 4$ ;  $P < 0.05$  vs. sham) days later. Nestin-immunoreactive processes emanating from cardiac neural stem cells were reduced in the left ventricle of rats treated with dexamethasone for 6 days and confirmed by the significant loss of nestin protein expression (Fig. 7). However, the loss of protein expression observed in the left ventricle of dexamethasone-treated rats was not associated with a concomitant downregulation of nestin mRNA (Fig. 7). Neural



**Fig. 4.** Streptozotocin-diabetic rats were not associated with widespread apoptosis. Parts **A,B**: TUNEL-positive cells were not detected in nestin-immunoreactive (red fluorescence) neural stem cells and nestin-negative cardiac myocytes in the normal rat heart ( $n = 2$ ). The nucleus was identified with to-pro<sup>3</sup> staining (blue fluorescence). Parts **C,D**: A TUNEL-positive cell (nuclear staining; green fluorescence) was detected in the population of nestin-immunoreactive neural stem cells (indicated by arrow) residing in the left ventricle of 7-day streptozotocin-induced diabetic rats ( $n = 2$ ). Furthermore, nestin-immunoreactive processes were apparently less abundant in the heart of 7-day streptozotocin-induced diabetic rats, as compared to normal rats. Lastly, TUNEL staining was absent in cardiac myocytes of 7-day streptozotocin-induced diabetic rats.

stem cell apoptosis as measured by the TUNEL assay (data not shown) was not detected in the heart of dexamethasone-treated rats. These data were indirectly reaffirmed as the total number of cells in the left ventricle of dexamethasone-treated rats as determined by to-pro<sup>3</sup> staining of the nucleus (Sham =  $1,507 \pm 43$  vs. DEX =  $1,640 \pm 10$  cells/mm<sup>2</sup>;  $n = 2$  for each group) was similar to sham rats.

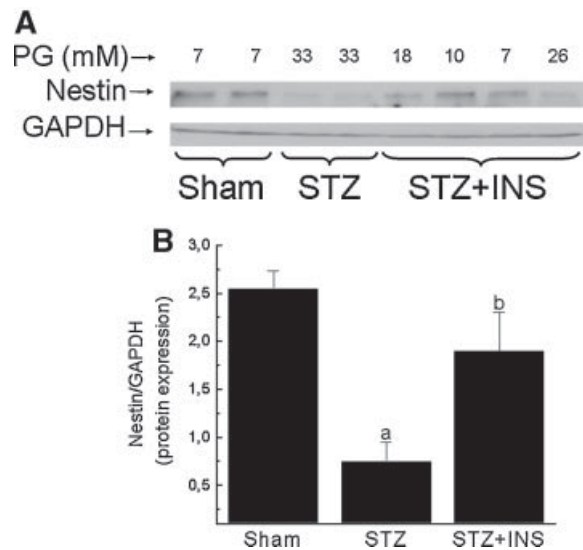
### Discussion

Following streptozotocin (STZ) injection of normal adult male rats, elevated plasma glucose was associated with a decline in body weight gain. Furthermore, as previously reported, left ventricular systolic and diastolic function were significantly compromised in STZ-diabetic rats (Joffe et al., 1999; Trost et al., 2002). The study by Joffe et al. (1999) reported that the heart of STZ-injected rats developed an eccentric pattern of cardiac hypertrophy and consistent with this observation, ANP mRNA levels were significantly increased in the left ventricle of 5-week STZ-diabetic rats. Previous studies from our lab identified a neural stem cell population intercalated among cardiac myocytes in both the rat and human myocardium characterized by a small cell body with nestin immunoreactive processes and the neural crest-related protein sox9 detected predominantly in the nucleus (El-Helou et al., 2008a). By contrast, nestin expression was not observed in normal cardiac myocytes. In the left ventricle of STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia, an immunofluorescence approach revealed an important and significant loss of nestin staining in the neural stem cell population. These data were reaffirmed by Western blot and the loss of nestin protein expression in the heart of

STZ-diabetic rats was associated with a concomitant downregulation of nestin mRNA. Thus, the present study has revealed that the cardiac neural stem cell phenotype was compromised in an experimental rat model of type I diabetes.

The significant reduction of nestin protein and mRNA expression in STZ-diabetic rats may be attributed directly to cardiac neural stem cell apoptosis. Three and 7 days following STZ injection, nestin protein and mRNA levels were significantly decreased in the heart. By contrast, left ventricular sox9 protein and mRNA expression in STZ-diabetic rats were similar to non-diabetic rats. Although sox9 was expressed in neural stem cells and cardiac myocytes, the lack of a change in STZ-diabetic rats indirectly suggested that the decreased protein content of nestin was not related to neural stem cell apoptosis. Indeed, the TUNEL assay revealed an absence of widespread apoptosis of neural stem cells in the ventricle of 3- and 7-day STZ-diabetic rats. Furthermore, cardiac myocyte apoptosis was not detected in the heart of STZ-diabetic rats. The lack of an apoptotic response was reaffirmed by to-pro<sup>3</sup> nuclear staining as the total number of cells in the left ventricle of 3- and 7-day STZ-diabetic rats were equivalent to non-diabetic rats. A similar observation was reported by Yoon et al. (2005) as global apoptosis in the myocardium was not observed during the early phase of cardiac remodeling in the STZ-diabetic rat characterized with contractile dysfunction (Yoon et al., 2005). Collectively, these data have demonstrated that the important loss of nestin protein and mRNA expression in the heart of STZ-diabetic rats was not attributed to neural stem cell apoptosis.

To examine the therapeutic potential of insulin, the peptide was administered twice a day for a period of 2 weeks to STZ-diabetic rats characterized with established hyperglycaemia and



**Fig. 5.** Insulin administration immediately after streptozotocin injection reduced plasma glucose levels and attenuated the loss of nestin protein expression. **Part A:** Insulin (INS) therapy reduced elevated plasma glucose (PG) levels in streptozotocin (STZ)-diabetic rats and concomitantly attenuated the loss of nestin protein expression. Furthermore, a casual relationship between nestin protein expression and plasma glucose levels was observed in STZ-diabetic rats treated with insulin. **Part B:** Semi-quantitative assessment revealed a significant decrease of nestin protein expression in the heart of 7-day STZ-diabetic rats ( $n = 5$ ) and an important therapeutic action of insulin ( $n = 5$ ). (a) Denotes  $P < 0.05$  versus sham, (b) denotes  $P < 0.05$  versus untreated STZ-diabetic rats, data was evaluated by a one-way ANOVA and a significant difference was determined by the Neuman–Keuls post hoc test.

decreased nestin expression in cardiac neural stem cells. Insulin therapy was modestly successful as the loss of body weight was partially reversed, and elevated ANP mRNA levels in the left ventricle of 5-week STZ-diabetic rats were normalized. By contrast, left ventricular contractile dysfunction persisted in insulin treated STZ-diabetic rats. However, insulin therapy had a beneficial effect on nestin protein expression as a modest significant recovery was observed in the cardiac neural stem cell population of STZ-diabetic rats. Based on these findings, a more aggressive insulin regimen may exert a greater beneficial effect on restoring the cardiac neural stem cell phenotype of STZ-diabetic rats with established hyperglycaemia (Nathan et al., 2005). Moreover, the modest beneficial effect provided the impetus to test the hypothesis that insulin therapy could prevent and/or attenuate the loss of nestin expression if administered immediately after STZ injection. Indeed, insulin therapy reduced plasma glucose levels and significantly attenuated the loss of nestin protein expression in the heart of STZ-diabetic rats. Furthermore, the efficacy of insulin treatment on nestin protein expression was casually related to plasma glucose levels. Collectively, these data suggest that the prevailing hyperglycaemic environment of STZ-diabetic rats

may have directly or indirectly contributed to the loss of nestin expression in cardiac neural stem cells.

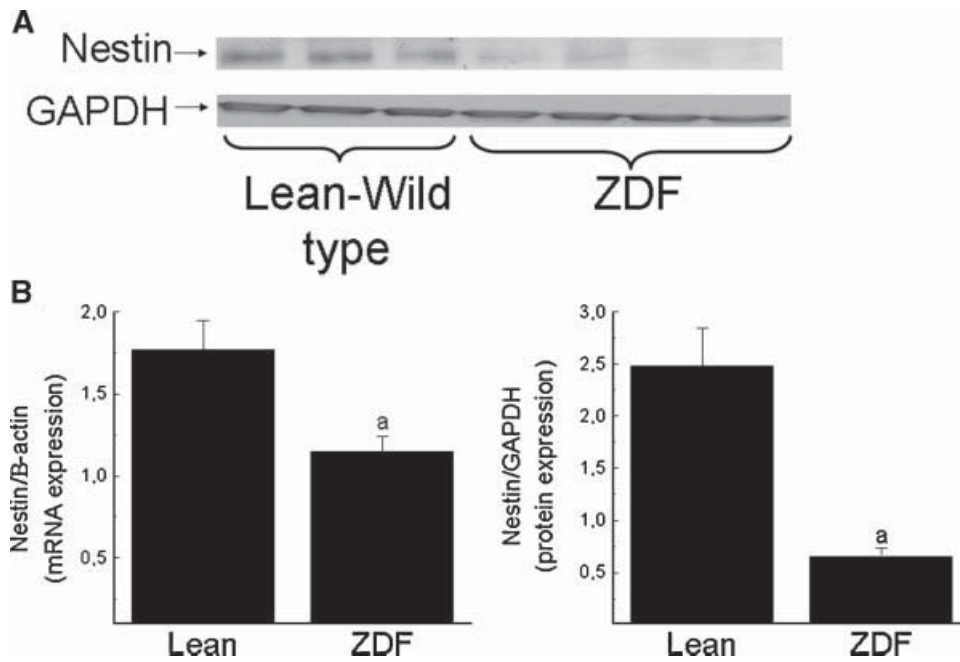
In contrast to the loss of body weight and absence of circulating insulin in the experimental model of STZ-induced type I diabetes, ZDF rats represent a model of type II diabetes associated with obesity, hyperglycaemia and hyperinsulinemia (Lajoie et al., 2006). Despite the multifactorial disease state, the prevailing hyperglycaemic environment of ZDF rats was comparable to that observed in STZ-diabetic rats and therefore provided the impetus to examine whether nestin expression in the cardiac neural stem cell population could be likewise decreased. In the left ventricle of ZDF rats, nestin protein content was significantly reduced and associated with a concomitant reduction of nestin mRNA expression. However, the reduction of nestin protein expression in the heart of ZDF rats was disproportionately greater than the decrease of mRNA. These data indirectly suggest that a post-translational mechanism of protein degradation may have contributed in part to the decreased expression of nestin in ZDF rats. Indeed, at least one study reported that the loss of nestin during neural stem cell differentiation occurred via protein degradation (Mellodew et al., 2004). Furthermore, *in vitro* studies revealed that elevated glucose promoted post-translational protein degradation (Zhou et al., 2007). Thus, the decreased expression of nestin in the heart of ZDF rats may have occurred in part via glucose-mediated protein degradation. In STZ-diabetic rats, the rapid loss of mRNA may have masked the post-translational protein degradation of nestin. Therefore, in an attempt to better understand the relationship between nestin protein and mRNA expression in a hyperglycaemic environment, an alternative *in vivo* model was employed. Consistent with previous studies, dexamethasone administration to normal adult male rats led to a gradual and significant rise of plasma glucose (Thompson et al., 2000). Following 6 days of dexamethasone treatment, the density of nestin immunoreactive processes emanating from cardiac neural stem cells was reduced. These findings were reaffirmed by Western blot, albeit the significant loss of protein content was not associated with a concomitant reduction of nestin mRNA. Thus, these data have demonstrated that nestin protein expression in cardiac neural stem cells can be selectively reduced in the absence of a change in mRNA and may be attributed in part to a post-translational mechanism of protein degradation. Although, elevated plasma glucose may represent an underlying mechanism, the potential direct effect of dexamethasone on the loss of nestin protein expression in cardiac neural stem cells cannot be excluded.

Impaired wound healing represents a typical feature of diabetes related in part to inadequate angiogenic and neurogenic responses (Polydefkis et al., 2004; Schiekofer et al., 2005). Work from our lab has demonstrated that following an ischemic insult to the heart, neural stem cells participated in sympathetic fiber innervation of the peri-infarct/infarct region (El-Helou et al., 2008a). Furthermore, a subpopulation of cells isolated from the scar represents a novel cellular substrate for *de novo* blood vessel formation (El-Helou et al., 2008a). Based on these observations, the loss of nestin protein expression in cardiac neural stem cells may compromise their biological role during reparative fibrosis and predispose the diabetic heart to maladaptive healing following ischemic injury.

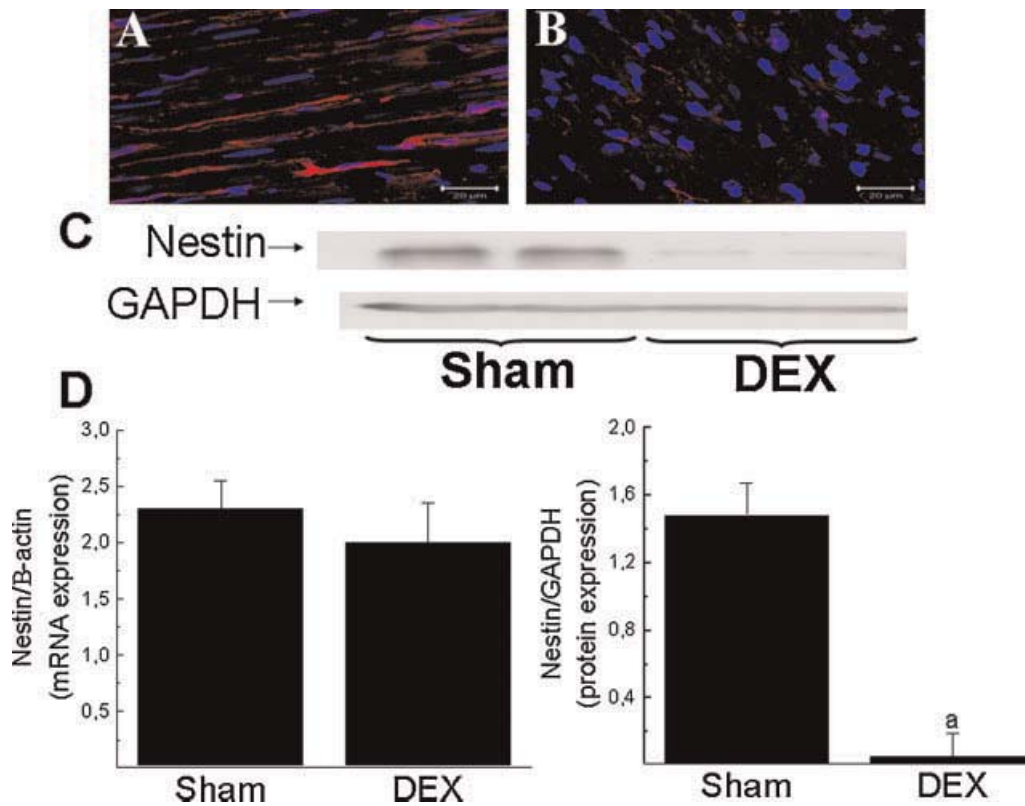
**TABLE 5.** Body weight, heart weight, plasma glucose and insulin levels in lean wild type and ZDF rats

	BW (g)	LV (mg)	LV/BW (mg/g)	Plasma Glucose (mM)	Plasma Insulin (ng/ml)
Lean wild type ( $n = 8$ )	$316 \pm 10$	$829 \pm 56$	$2.62 \pm 0.11$	$8 \pm 0.7$	$1.2 \pm 0.1$
ZDF-diabetic ( $n = 8$ )	$411 \pm 18^a$	$896 \pm 21$	$2.18 \pm 0.07^a$	$37 \pm 2^a$	$3.6 \pm 0.4^a$

ZDF indicates Zucker diabetic fatty rat; BW, body weight and LV, left ventricle. Data are presented as mean  $\pm$  SEM, analyzed by a student's unpaired *t*-test, (a) represents  $P < 0.05$  versus sham and (n) number of rats examined.



**Fig. 6.** Nestin protein and mRNA expression in the left ventricle of ZDF rats. ZDF rats were obese, hyperglycaemic and hyperinsulinemic (please see Table 5). Part A: Nestin protein content in the left ventricle of ZDF rats ( $n = 8$ ) was reduced as compared to lean wild type rats ( $n = 8$ ), whereas GAPDH protein content was unchanged. Part B: Nestin protein and mRNA ( $n = 4$  for each group) expression were significantly reduced in the left ventricle of ZDF rats compared to lean wild type rats. (a) Denotes  $P < 0.05$  versus lean wild-type rats and a significant difference was determined by a Student's unpaired t-test.



**Fig. 7.** Nestin protein expression in the left ventricle of dexamethasone-treated normal rats. Part A: Nestin-immunoreactive (red fluorescence) neural stem cells intercalated among nestin-negative cardiac myocytes in the normal rat heart. The nucleus is detected with to-pro<sup>3</sup> staining (blue fluorescence). Part B: The density of nestin immunoreactive processes emanating from cardiac neural stem cells was reduced in the left ventricle of dexamethasone (DEX)-treated rats. Part C: Nestin protein content was decreased in the left ventricle of DEX-treated rats ( $n = 4$ ) versus sham rats ( $n = 4$ ). GAPDH protein content was identical between non-treated and DEX-treated rats. Part D: Semi-quantitative analysis revealed a significant loss of nestin protein expression in the left ventricle of DEX-treated rats ( $n = 4$ ) versus sham rats ( $n = 4$ ), whereas nestin mRNA levels were unchanged ( $n = 4$  for each group). (a) Denotes  $P < 0.05$  versus sham rats and a significant difference was determined by a Student's unpaired t-test.

## Acknowledgments

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”. Viviane El-Helou is a Ph.D. student funded by the Canadian Institutes of Health Research. Pauline C. Béguin is a postdoctoral fellow funded by the Bourse Lavoisier du Ministère des Affaires Étrangères et Européennes (France).

## Literature Cited

- Beller GA. 2001. Coronary heart disease in the first 30 years of the 21st century. *Circulation* 103:2428–2435.
- Carr RW, Delaney CA, Westerman RA, Roberts RG. 1993. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* 4:467–470.
- El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A. 2005. Resident nestin<sup>(+)</sup> neural stem cells and fibres were detected in the normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* 46:1219–1225.
- El-Helou V, Béguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, Brugada R, Aumont A, Biernaskie J, Villeneuve L, Leung TK, Fernandes KJL, Calderone A. 2008a. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 45:694–702.
- El-Helou V, Proulx C, Gosselin H, Clement R, Mimeo A, Villeneuve L, Calderone A. 2008b. Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region. *J Appl Physiol* 104:150–156.
- Hayworth CR, Moody SE, Chodosh LA, Krieg P, Rimer M, Thompson WJ. 2006. Induction of neuregulin in mouse schwann cells in vivo mimics responses to denervation. *J Neurosci* 26:6873–6884.
- Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. 1999. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non-insulin-dependent diabetic rat. *J Am Coll Cardiol* 34:2111–2119.
- Kang H, Tian L, Son YJ, Zuo Y, Procaccino D, Love F, Hayworth C, Trachtenberg J, Mikesh M, Sutton L, Ponomareva O, Mignone J, Enikolopov G, Rimer M, Thompson W. 2007. Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity. *J Neurosci* 27:5948–5957.
- Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. 1998. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 3:194–201.
- Kishimoto S, Maruo M, Ohse C, Yasuno H, Kimura H, Nagai T, Maeda T. 1982. The regeneration of the sympathetic catecholaminergic nerve fibers in the process of burn wound healing in guinea pigs. *J Invest Dermatol* 79:141–146.
- Lajoie C, Trudeau F, Lavoie N, Massicotte G, Gagnon S, Béliveau L, Calderone A. 2006. The rapid onset of hyperglycemia in ZDF rats was associated with a widespread alteration of metabolic proteins implicated in glucose metabolism in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 84:1205–1213.
- Mellodew K, Suhr R, Uwanogho DA, Reuter I, Lendahl U, Hodges H, Price J. 2004. Nestin expression is lost in a neural stem cell line through a mechanism involving the proteasome and notch signalling. *Develop Brain Res* 151:13–23.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JYC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. 2005. Diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353:2643–2653.
- Polydefkis M, Hauer P, Sheth S, Sirdofsky M, Griffin JW, McArthur JC. 2004. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: Studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. *Brain* 127:1606–1615.
- Schiekofer S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. 2005. Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1603–1609.
- Shiomi T, Tsutsui H, Ikeuchi M, Matsusaka H, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Kubota T, Takeshita A. 2003. Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental infarction. *J Am Coll Cardiol* 42:165–172.
- Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. 2002. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes. *Circulation* 105:1727–1733.
- Thompson MD, Gallagher WJ, Iuzzo PA, Lanier WL. 2000. The effect of chronic dexamethasone-induced hyperglycemia and its acute treatment with insulin on brain glucose and glycogen concentrations in rats. *Anesthesiology* 93:1279–1284.
- Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. 2002. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51:1166–1171.
- Yoon YS, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park JS, Gwon HC, Kirchmair R, Bahlman F, Walter D, Curry C, Hanley A, Isner JM, Losordo DW. 2005. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: Restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation* 111:2073–2085.
- Zhou J, Livak MFA, Bernier M. 2007. Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptors in islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E538–E547.