

Université de Montréal

**L'expression de nestine est associée à l'entrée des  
cardiomyocytes de rats néonataux dans le cycle cellulaire.**

**Par**

**Marc-André Méus**

Institut de Cardiologie de Montréal  
Département de Physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc)  
en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Août 2014

©Marc-André Méus, 2014

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

**L'expression de nestine est associée à l'entrée des  
cardiomyocytes de rats néonataux dans le cycle cellulaire.**

Présenté par :

**Marc-André Méus**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes**

Dre Michèle Brochu  
*Président-rapporteur*

Dr Rémy Sauvé  
*Membre du jury*

Dr Angelino Calderone  
*Directeur de recherche*

Mémoire accepté le 15 mai 2015

## Résumé

L'infarctus du myocarde est une des conséquences possibles de l'ischémie cardiaque; il se traduit par la mort des cardiomyocytes se situant en aval du blocus coronaire, puis par la formation d'une cicatrice formée essentiellement de dépôts de matrices extracellulaires sécrétées par les myofibroblastes. Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire de classe VI couramment associée à la prolifération et à la migration cellulaire. Chez l'homme et les rongeurs, à la suite d'un infarctus du myocarde, une sous-population de cardiomyocytes localisée à la zone infarctée/péri-infarctée exprimait la forme striée de nestine. Le but principal de cette étude était de déterminer la source cellulaire des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> observée dans le cœur infarcté ainsi que le mécanisme de signalisation cellulaire sous-jacent impliqué dans l'expression de nestine. L'utilisation de souris transgénique a révélé que l'augmentation des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur infarcté des souris n'était pas attribuable à la différenciation de cellules souches/progénitrices nestine<sup>(+)</sup> en cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup>. Le traitement des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux avec l'activateur des protéines kinases C PDBu et l'inhibition concomitante des voies p38 MAPK a mené à l'augmentation du nombre de ces cellules exprimant nestine. De plus, une population importante de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux a incorporé la bromodésoxyuridine, signe d'une capacité à réentrer dans le cycle cellulaire et à synthétiser de l'ADN. Sur la base de ces observations, l'apparition de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur infarcté des rongeurs et des hommes pourrait possiblement refléter une sous-population de cardiomyocytes en prolifération tentant de régénérer le cœur infarcté.

Mots clés : Infarctus du myocarde, Protéine kinase C, p38 MAPK, régénération cardiaque

## Abstract

Myocardial infarction is one of the possible outcomes of cardiac ischemia and is characterized by cardiomyocyte death downstream of the site of occlusion and subsequent scar formation by myofibroblasts secreting extracellular matrix proteins. Nestin is a class VI intermediate filamentous protein associated with cellular proliferation and migration. Following a myocardial infarction, striated nestin protein expression was detected in a subpopulation of cardiac myocytes bordering the peri-infarct/infarct region of the rodent and human heart. The primary goal of the present thesis was to determine the cellular source of the nestin<sup>(+)</sup> cardiac myocytes selectively observed in the myocardial infarcted heart and the underlying signalling events implicated in nestin expression. Employing a transgenic approach, the appearance of nestin<sup>(+)</sup> cardiac myocytes in the infarcted mouse heart was not attributed to the differentiation of nestin<sup>(+)</sup> neural progenitor/stem cells. The treatment of neonatal rat ventricular myocytes with the protein kinase C (PKC) activator PDBu and the concomitant inhibition of the p38 MAPK pathway markedly increased the percentage of cells expressing nestin. Furthermore, a significant population of nestin-expressing neonatal rat ventricular myocytes incorporated bromodeoxyuridine, revealing an ability to re-enter the cell cycle and undergo DNA synthesis. On the basis of these observations, the appearance of nestin<sup>(+)</sup> cardiac myocytes in the infarcted rodent and human heart may reflect a subpopulation of proliferating cardiomyocytes attempting to regenerate the ischemically damaged heart.

Keywords : Myocardial infarction, Protein kinase C, p38 MAPK, Cardiac regeneration

## Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des Matières .....	v
Liste des sigles et abréviations .....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des figures de la partie introduction.....	ix
Liste des figures de la partie résultats.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
Le cœur.....	2
Cavités et gros vaisseaux du cœur.....	3
Le muscle cardiaque .....	4
Circulation coronarienne .....	5
Ischémie cardiaque.....	6
Infarctus du myocarde.....	6
Régénération cardiaque.....	11
Cardiomyocytes.....	11
Le cycle cellulaire.....	14
L'expression et le rôle des régulateurs du cycle cellulaire durant le développement cardiaque.....	17
Cellules souches.....	19
Cellules progénitrices cardiaques résidentes du cœur adulte .....	20
Nestine.....	21
Cdk5 .....	22
Voies de signalisation .....	24
Mitogen-activated protein kinases (MAPKs).....	24
P38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPKs) .....	25
Protéines kinases C : .....	28
Pseudosubstrat .....	29
Phosphorylation des protéines kinases C (PKC).....	30
PDK-1 et la phosphorylation de la boucle d'activation .....	31
Phosphorylation du motif de tour .....	31
La phosphorylation du motif hydrophobique.....	31
Phosphatidylsérine .....	32
Le diacylglycérol et les phorbols esters .....	32
Calcium.....	32
Les protéines d'ancrage et d'échafaudage .....	33
Souris transgénique.....	34
Micro-injection d'ADN recombinant dans les oocytes de souris.....	34
Technique conventionnelle de ciblage génique.....	35
Souris KO .....	36
Souris KI.....	37
Objectifs de l'étude.....	38

Matériels et Méthodes : .....	39
Culture cellulaire de myocytes et de fibroblastes ventriculaires de rats néonataux : .....	39
Passage des fibroblastes cardiaques de rats néonataux .....	40
Immunofluorescence et microscopie confocale .....	40
Incorporation de la Thymidine-H3 .....	40
Électrophorèse et immunobuvardage de type western : .....	41
Souris transgénique nestine/GFP .....	42
Statistiques .....	43
Modèle d'infarctus du myocarde .....	43
Résultats .....	44
Détermination du rôle de nestine dans les cardiomyocytes à la suite d'un infarctus du myocarde .....	45
Détermination de l'origine des cellules exprimant nestine et les voies de signalisation contrôlant sa production .....	51
L'inhibition des voies p38 MAPK mène à l'augmentation des cardiomyocytes nestine <sup>(+)</sup> : .....	56
Les cellules ventriculaires de rats néonataux nestine <sup>(+)</sup> peuvent incorporer BRDU .....	61
Vérification des résultats obtenus par BRDU: .....	71
Discussion : .....	74
Limites de l'étude .....	81
Conclusion .....	85
Références .....	88

## Liste des sigles et abréviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
ATF-2 : 2<sup>e</sup> facteur activateur de la transcription  
BRDU : bromodéoxyuridine  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
Cdk5 : kinase dépendante des cyclines 5  
DAG : diacylglycérol  
DMEM : *dulbecco's modified eagle medium*  
ECM : matrice extracellulaire  
ERK : kinases régulées par les signaux extracellulaires  
ESCs : cellules souches embryonnaires  
FBS : sérum de veau fœtal  
GFAP : protéine acide fibrillaire gliale  
GFX : GF 109203X  
HBSS : *hank's balanced salt solution*  
H3P : histone-3 phosphorylée  
JNK : les kinases amino-terminale c-Jun  
KI : insertion génétique (knock-in)  
KO : invalidation génétique (knock-out)  
LV : ventricule gauche  
MAPKs : protéines kinases activées par un agent mitogène  
MEF2 : 2<sup>e</sup> facteur améliorant les myocytes  
MI : infarctus du myocarde  
MKs : les kinases activées par les MAPKs  
MNKs : les kinases interagissant avec les MAPKs  
MPF : facteur de promotion de la phase mitotique  
MSK : les kinases activées par le stress et les agents mitogènes  
NGS : sérum de chèvre normal  
NNVF : fibroblaste ventriculaire néonatal  
PBS : tampon phosphate salin

PDK-1 : kinase phosphoinositide-dépendante

PKB : Akt / protéine kinase B

PKC : protéines kinases C

PS : phosphatidylsérine

RPM : rotation par minute

RSKs : les kinases S6 ribosomiques

S.E.M. : écart type à la moyenne

TCA : acide trichloracétique

TGF-  $\beta$  : facteur de croissance transformant bêta

T75 : flasque de 75mm<sup>2</sup>

$\alpha$ -SMA : actine des muscles lisses alpha



## Liste des figures

### Liste des figures de la partie introduction

Figure 1 : Péricarde et tuniques de la paroi du cœur.....	2
Figure 2 : Grande et petite circulation.....	3
Figure 3 : Muscle cardiaque .....	4
Figure 4 : Infarctus du myocarde.....	7
Figure 5 : Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes pendant la phase proliférative du remodelage cardiaque.....	9
Figure 6 : Fibrose réactive vs Fibrose réparatrice : L'infarctus du myocarde a provoqué une augmentation de l'expression du collagène $\alpha 1$ (rouge et jaune) dans le myocarde non-infarci et à la région cicatricielle par rapport à un cœur non infarci (marquage quasi absent).....	10
Figure 7 : Contrôle du cycle cellulaire des cardiomyocytes et de ses progéniteurs .....	13
Figure 8 : Cycle cellulaire .....	15
Figure 9 : Sortie du cycle cellulaire des cardiomyocytes.....	17
Figure 10 : Modèle de la régulation des voies de signalisation de Cdk5 par nestine dans les myofibroblastes en différenciation .....	23
Figure 11 : Activation des voies MAPKs les plus étudiées .....	25
Figure 12 : Voies de signalisation de la p38 MAPK.....	27
Figure 13 : Structure des PKC et leurs facteurs d'activation .....	29
Figure 14 : Sites de phosphorylation des PKC .....	30
Figure 15 : Régulation des PKC.....	33
Figure 16 : Souris KO et KI.....	37
Figure 17 : Plasmide nestine/GFP .....	42

### Liste des figures de la partie résultats

Figure 1 : Localisation cardiaque de nestine sous sa forme protéique à la suite d'un infarctus du myocarde .....	46
Figure 2 : L'infarctus du myocarde mène à une augmentation des cardiomyocytes nestine <sup>(+)</sup> desmine <sup>(+)</sup> .....	47
Figure 3 : Colocalisation cellulaire du marquage nestine/GFP dans le tissu cardiaque d'une souris transgénique nestine/GFP MI .....	48
Figure 4 : Population hétérogène de cellules cardiaque d'une souris transgénique nestine/GFP MI marqué par immunofluorescence via un anticorps dirigé contre nestine (fluorescence rouge) et contre GFP (fluorescence verte) .....	49
Figure 5 : Absence de colocalisation du marquage nestine/GFP dans les cardiomyocytes d'une souris transgénique nestine/GFP MI .....	50
Figure 6 : Population hétérogène de fibroblastes et de cardiomyocytes de rats néonataux marqués avec le collagène $\alpha 1$ (fluorescence verte), troponine T cardiaque (fluorescence rouge), DAPI (fluorescence bleue) .....	52

Figure 7 : Population hétérogène de fibroblastes et de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux marqués avec le collagène $\alpha 1$ (fluorescence verte), nestine (fluorescence rouge), DAPI (fluorescence bleue) .....	53
Figure 8 : Cellules ventriculaires de rats néonataux marqués avec le collagène $\alpha 1$ (fluorescence verte), nestine (fluorescence rouge), DAPI (fluorescence bleue) .....	54
Figure 9 : Effet du PDBu sur la phosphorylation de la p38 MAPK au niveau des cellules ventriculaires de rats néonataux .....	57
Figure 10 : Effet de la stimulation in vitro des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'expression protéique de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	58
Figure 11: Effet de la stimulation in vitro du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'expression protéique de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	59
Figure 12 : Effet du PDBu et du SB203580 sur la phosphorylation de la p38 MAPK au niveau des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux .....	60
Figure 13 : Population hétérogène de cellules ventriculaires de rats néonataux marqués avec le collagène $\alpha 1$ (fluorescence verte), nestine (fluorescence rouge), BRDU (fluorescence mauve) et DAPI (fluorescence bleue) .....	63
Figure 14 : Effet de la stimulation in vitro des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	64
Figure 15 : Effet de la stimulation in vitro du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	65
Figure 16 : Effet de la stimulation in vitro des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués positivement via un anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque .....	66
Figure 17 : Effet de la stimulation in vitro du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués positivement avec un anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque .....	67
Figure 18 : Effet de la stimulation in vitro des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes nestine <sup>(+)</sup> de rats néonataux marqués négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	68
Figure 19 : Effet de la stimulation in vitro du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes nestine <sup>(+)</sup> de rats néonataux marqués négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	69
Figure 20 : Effet de la stimulation in vitro des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les fibroblastes cardiaques de rats néonataux marqués positivement via un anticorps dirigé contre le collagène $\alpha 1$ .....	70
Figure 21 : Effet de la stimulation des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur le pourcentage d'incorporation de la thymidine-H3 dans les fibroblastes collagène $\alpha 1$ <sup>(+)</sup> ventriculaires de rats néonataux : .....	72
Figure 22 : Effet de l'inhibition des voies PKC sur le pourcentage d'incorporation de la thymidine-H3 dans les fibroblastes ventriculaires collagène $\alpha 1$ <sup>(+)</sup> de rats néonataux à la suite d'une stimulation au PDBu $10^{-7}M$ : .....	73

## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Angelo Calderone sans qui cette expérience inoubliable n'aurait jamais été possible. Angelo a su me guider tout au long de ma maîtrise et a su me motiver dans les moments plus difficiles. Grâce à son encadrement, il m'a permis de m'améliorer en tant que personne et en tant que scientifique. Je garderai à tout jamais un bon souvenir du temps passé en sa compagnie.

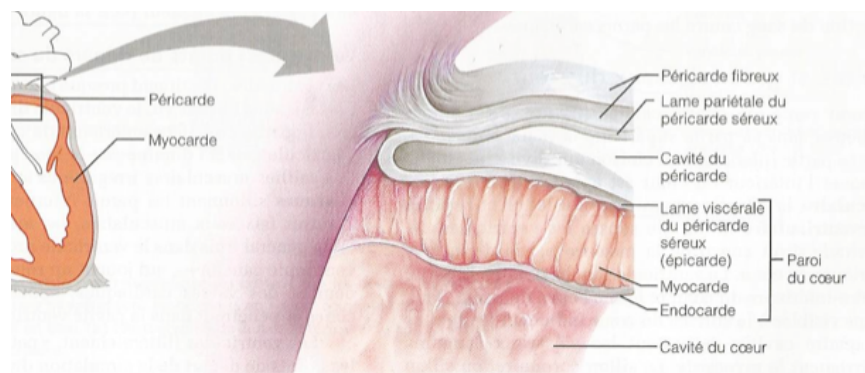
J'aimerais également remercier mes collègues sans qui les repas auraient été beaucoup moins divertissants : Emma Dedelis, Vanessa Hertig, Andréanne Chabot, Marie-Hélène Clavet, Kim Tardif, Valérie Pedneault-Gagnon, Nassiba Merabet et Xavier Levac.

Au final, j'aimerais remercier mes parents qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes études dans le domaine de la santé. Sans leur appui, cet accomplissement n'aurait pas été possible.

# **Introduction**

## Le cœur

Le cœur est une pompe essentielle à la survie des organismes. Ce dernier est composé de deux couches : le péricarde fibreux constitue la couche externe et le péricarde séreux constitue la couche interne. La couche externe est lâche et composée de tissus conjonctifs denses, elle protège le cœur, s'assure de son positionnement et évite l'amoncellement excessif de sang. Le péricarde séreux est divisé en deux lames : la lame pariétale et la lame viscérale (épicarde). Ces deux lames sont séparées par une mince cavité remplie de liquide qui sert à lubrifier et à atténuer la friction entre les lames créée par les battements du cœur (Figure 1). La paroi du cœur est composée de trois tuniques, la tunique externe (l'épicarde), la tunique intermédiaire (le myocarde) qui est la partie musculaire du cœur et, finalement, l'endocarde qui est la tunique interne. Chez les personnes âgées, il n'est pas rare d'observer une infiltration de graisse dans la tunique externe du cœur. Le myocarde est essentiellement composé de cellules musculaires, c'est grâce à cette couche et ses capacités contractiles que le cœur assure sa fonction première, celle de pompe. Un réseau formé des cellules du muscle cardiaque et de tissus conjonctifs assure l'intégrité structurale du myocarde. Aux points de sortie des gros vaisseaux et autour des valves cardiaques, le réseau fibreux s'épaissit et forme des points de renforcements pour ces structures. L'endocarde constitue la tunique interne, il s'agit d'un endothélium qui diminue la friction entre le sang et les parois cardiaques (Marieb, 2005).

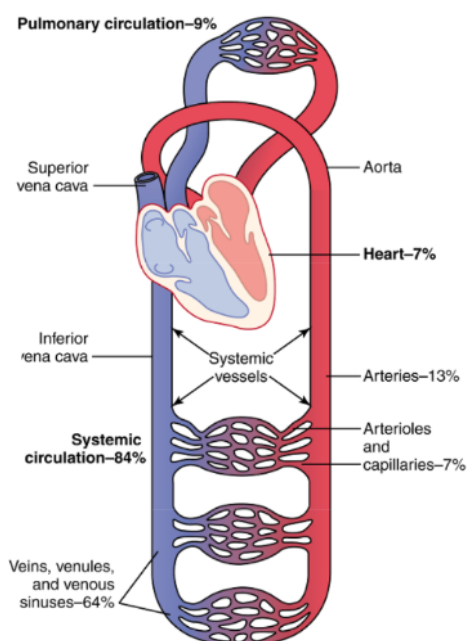


**Figure 1 : Péricarde et tuniques de la paroi du cœur**

Marieb, E. N. (2005). *Anatomie et physiologie humaines*. (3e éd.<sup>e</sup> éd.). Saint-Laurent, Qué.: Éd. du Renouveau pédagogique. Page 697

## Cavités et gros vaisseaux du cœur

Le cœur contient quatre cavités, deux oreillettes dans sa partie supérieure et deux ventricules dans sa partie inférieure. Les oreillettes sont séparées par le septum interauriculaire tandis que les ventricules sont séparés par le septum interventriculaire. Les oreillettes sont les portes d'entrée par lequel le sang provenant de la circulation est acheminé au cœur. Puisque les oreillettes ne contribuent pas énormément à l'action de pompage du cœur et qu'une faible contraction de ces dernières est suffisante à faire passer le sang des oreillettes aux ventricules, elles sont de petites tailles et leur paroi est assez mince. Trois veines entrent dans l'oreillette droite, il s'agit des veines caves supérieure et inférieure qui acheminent le sang provenant respectivement des régions au-dessus et au-dessous du diaphragme et du sinus coronaire qui recueille le sang drainé du myocarde. L'oreillette gauche est quant à elle alimentée en sang par les quatre veines pulmonaires. Ces veines ramènent le sang oxygéné des poumons au cœur. Étant donné que ce sont essentiellement les ventricules qui assurent la fonction de pompe du cœur, leur paroi est épaisse et ils représentent la majorité de la masse du cœur. C'est par leur contraction que le sang est expulsé du cœur vers les vaisseaux. Le ventricule droit expédie le sang dans les poumons via



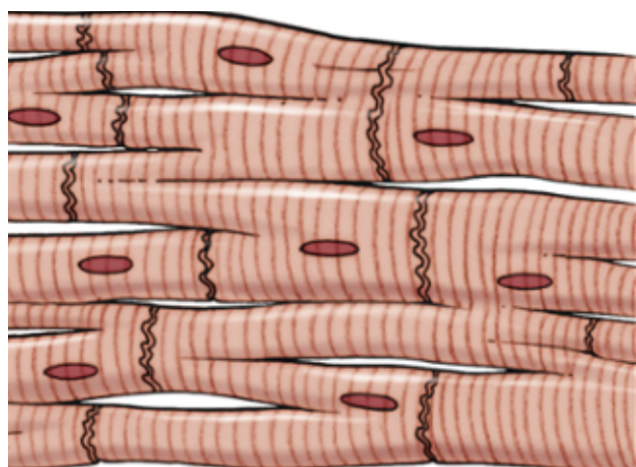
le tronc pulmonaire. Les vaisseaux qui apportent le sang du cœur aux poumons et des poumons au cœur constituent la petite circulation, également connue sous le nom de circulation pulmonaire. C'est dans les poumons que va se dérouler les échanges gazeux, le sang va se débarrasser du dioxyde de carbone et s'alimenter en oxygène. Le ventricule gauche quant à lui propulse le sang dans tous les organes via l'aorte qui constitue la plus grande des artères. La circulation systémique ou grande circulation (Figure 2) est quant à elle constituée des vaisseaux qui assurent l'irrigation des tissus de l'organisme et du retour sanguin vers le cœur (Marieb, 2005).

**Figure 2 : Grande et petite circulation**

Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. (12th<sup>e</sup> éd.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.

## Le muscle cardiaque

Le cœur est composé de 3 types de muscles, le muscle auriculaire, le muscle ventriculaire et des fibres spécialisées de type excitatrice et conductrice. Les muscles auriculaires et ventriculaires se contractent de la même façon que le muscle squelettique à l'exception que la durée de contraction de ce dernier est plus courte. Les fibres spécialisées ne se contractent que faiblement puisqu'elles ne contiennent pas beaucoup de fibres contractiles. Grâce à leur autorhythmicité, les fibres spécialisées assurent un rôle dans la création du potentiel d'action et dans la conduction du potentiel d'action à travers le cœur. Ces fibres fournissent un système excitateur qui contrôle la rythmicité du cœur. Tout comme le muscle squelettique, le muscle cardiaque (Figure 3) est strié et possède des filaments d'actine et de myosine qui glissent les uns sur les autres lors de la contraction musculaire. Le muscle cardiaque est composé de fibres qui sont reliées entre elles par des disques intercalaires. Ces disques sont des membranes cellulaires qui relient les cellules cardiaques entre elles. Les fibres cardiaques sont donc composées de plusieurs cellules reliées entre elles en parallèle et en série les unes avec les autres. À chaque disque intercalaire, les cellules s'unissent et forment des jonctions perméables nommées jonctions communicantes. Ces jonctions permettent le passage rapide d'ions entre les cellules cardiaques ce qui permet de diffuser facilement le potentiel d'action à travers le cœur (Hall & Guyton, 2011).



**Figure 3 : Muscle cardiaque**

Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. (12th<sup>e</sup> éd.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.

## **Circulation coronarienne**

Bien qu'il y ait de large quantité de sang qui parcourt en continuité les cavités cardiaques, cela ne suffit pas à alimenter le cœur en oxygène et en nutriments au-delà de l'endocarde, car le myocarde est trop épais pour la diffusion de ces derniers. Le cœur est donc dépendant de la circulation la moins étendue de l'organisme pour ses besoins, la circulation coronarienne. Les artères coronaires droite et gauche constituent les seuls apports artériels à cette circulation. Ces deux artères se divisent en rameaux et ceux-ci vont irriguer le cœur. Les ramifications des artères coronaires forment de nombreuses anastomoses, ce sont des collatérales qui servent à l'irrigation du muscle cardiaque. Grâce à ces collatérales, une obstruction partielle d'une artère coronaire peut ne pas mener à une nécrose du tissu cardiaque. Les artères coronaires ainsi que leurs principales ramifications sont logées dans l'épicarde ou juste en dessous. Leurs branches pénètrent le myocarde et y apportent un apport sanguin intermittent et rythmique. L'afflux sanguin est limité aux diastoles, puisque lorsque le cœur est en systole, les branches sont comprimées par le myocarde et leurs entrées sont partiellement obstruées par la valve aortique qui est ouverte lors de la contraction myocardique. Bien que le cœur ne représente qu'une petite partie de la masse corporelle (environ le 1/200e), celui-ci, mais principalement le ventricule gauche de par sa fonction, utilise une grande partie du sang, soit le 1/20<sup>e</sup>. Après avoir alimenté le myocarde en nutriments et en oxygène, le sang veineux quitte le myocarde via les veines cardiaques. Le sinus coronaire est formé des différentes veines cardiaques et est responsable de déverser le sang veineux dans l'oreillette droite. Des troubles avec la circulation coronarienne peuvent entraîner divers troubles dont l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde. L'angine de poitrine est une douleur ressentie au niveau du sternum causée par l'arrêt temporaire de l'irrigation du myocarde. Cet arrêt cause une hypoxie momentanée qui affaiblit les cellules myocardiques. Si cet arrêt est temporaire, les cellules survivent, mais s'il est permanent, elles vont mourir et il s'agira plutôt d'un infarctus du myocarde. La diminution momentanée de l'irrigation du myocarde peut résulter de spasmes des artères coronaires dû au stress (Marieb, 2005).



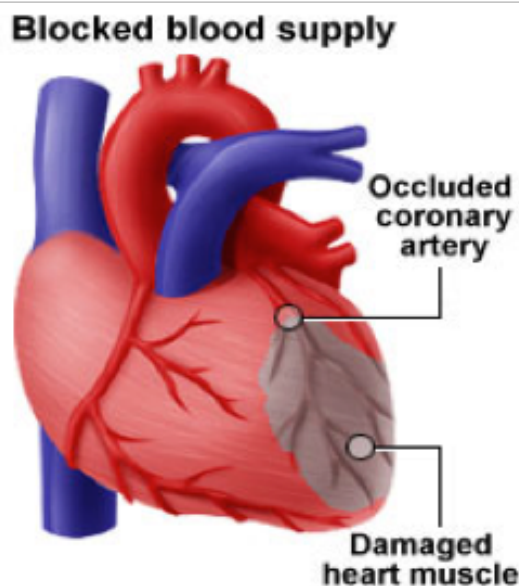
## **Ischémie cardiaque**

La cause la plus commune de mort dans la société occidentale est l'ischémie cardiaque qui se traduit par un apport insuffisant de sang au cœur par les artères coronaires. En 2011, environ 35% de la population des États-Unis décédaient des suites d'une ischémie cardiaque, soit subitement dû à une obstruction complète d'une artère coronaire, ou suite à une fibrillation cardiaque ou encore, à long terme, dû à un affaiblissement progressif de la pompe cardiaque. La cause la plus fréquente d'ischémie cardiaque est l'athérosclérose, cette maladie touche principalement les gens qui ont une prédisposition génétique à cette maladie, les obèses, les personnes ayant un surplus de poids, les gens avec un mode de vie sédentaire, les gens faisant de la haute pression et finalement les gens dont l'endothélium coronaire est endommagé. Chez ces personnes, des dépôts de cholestérol se logent progressivement sous l'endothélium à différents endroits et ces endroits deviennent un site d'invasion pour du tissu fibreux, qui dans la plupart des cas, finit par se calcifier. Lorsque ce processus se produit dans l'une des artères coronaires, la circulation via cette coronaire est réduite ou bloquée et il y a ischémie cardiaque. Lorsqu'une occlusion se produit dans une artère coronaire, les anastomoses se dilatent de façon à faire bifurquer la circulation sanguine. Un mois après l'occlusion, la circulation collatérale assure un flux coronaire quasi normal. C'est pour cette raison que dépendamment de la sévérité de l'occlusion coronaire, les patients dont le tissu musculaire cardiaque n'est pas trop atteint peuvent atteindre une guérison quasi complète (Hall & Guyton, 2011).

## **Infarctus du myocarde**

Un infarctus du myocarde se produit immédiatement à la suite de l'occlusion d'une artère coronaire, le muscle cardiaque du ventricule gauche situé en aval de l'obstruction reçoit alors peu ou pas de sang dépendamment de l'afflux provenant des vaisseaux collatéraux. Le muscle cardiaque est dit infarci puisqu'il est incapable de maintenir sa fonction contractile habituelle. Le processus global est appelé infarctus du myocarde et, peu après le commencement de ce dernier, une petite quantité de sang provenant des vaisseaux collatéraux commence à s'infiltrer dans la zone infarctée. Cette infiltration de sang se fait avec la dilatation des vaisseaux locaux provoque une accumulation de sang stagnant. Une fois que le muscle cardiaque épuise les réserves d'oxygène de ce sang, la région du cœur qui est infarctée va prendre une teinte bleutée et va paraître engorgée de sang bien qu'il n'y ait pas d'afflux sanguin. Après quelques heures sans afflux de nouveau sang oxygéné, les cellules cardiaques meurent (Figure 4). Toutefois, dans le cas d'un petit

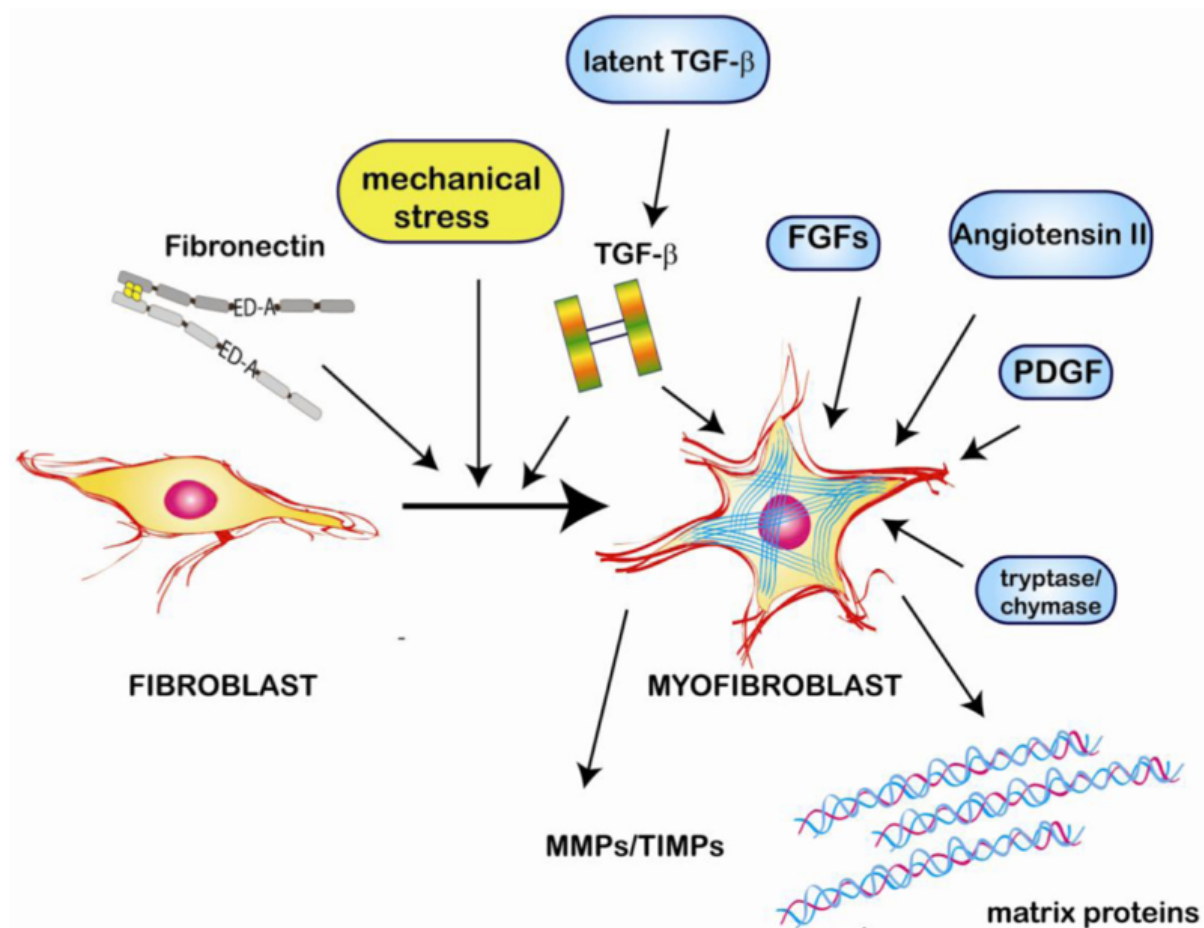
infarctus, si la circulation coronarienne est maintenue à 15 ou 30% de son afflux normal, le muscle cardiaque ne mourra pas (Hall & Guyton, 2011).



**Figure 4 : Infarctus du myocarde**

En réponse à l'infarctus du myocarde, le ventricule gauche (LV) subit des changements moléculaires, cellulaires et extracellulaires connus sous le nom de remodelage du ventricule gauche. Une partie importante du remodelage du LV est le dépôt de matrice extracellulaire (ECM). Cette étape est essentielle à la formation de la cicatrice qui va remplacer les cardiomyocytes morts, mais le dépôt de l'ECM mène également à l'insuffisance cardiaque (Turner, 2011). Les fibroblastes cardiaques sont les cellules interstitielles les plus présentes dans le cœur adulte des mammifères, ces cellules sont les premières productrices d'ECM, elles sont donc responsables de maintenir l'intégrité de la matrice cardiaque (Camelliti, Borg, & Kohl, 2005; Souders, Bowers, & Baudino, 2009). Les fibroblastes sont des cellules réparatrices activées abondamment à la suite d'un dommage tissulaire. La grande majorité des maladies cardiaques est associée à une prolifération et à une activation de ces cellules (Chen & Frangogiannis, 2013). Puisque le cœur adulte des mammifères a une capacité très limitée de régénération, la mort d'un grand nombre de cardiomyocytes durant la phase aiguë de l'infarctus du myocarde enclenche un processus inflammatoire et une réponse réparatrice qui aura pour but de se débarrasser des cardiomyocytes morts et de les remplacer par une cicatrice formée majoritairement de collagène

(Frangogiannis, 2008). La relâche de facteurs pro-inflammatoires induit le recrutement de neutrophiles et de monocytes pro-inflammatoires dans le myocarde infarci (Dewald et al., 2005; Nahrendorf et al., 2007). Ces leucocytes activés vont nettoyer la zone infarctée en phagocytant les cellules nécrosées ainsi que les débris de la matrice extracellulaire. Une fois que la zone infarctée est nettoyée, l'organisme met fin à la réponse inflammatoire, les neutrophiles subissent l'apoptose et sont phagocytés par des macrophages (Chen & Frangogiannis, 2013; Nahrendorf et al., 2007). Pendant ce temps, les lymphocytes et les macrophages relâchent des facteurs suppresseurs de signaux pro-inflammatoires tels que l'interleukine 10 et le transforming growth factor bêta (TGF- $\beta$ ). La fin de la réponse inflammatoire est suivie d'une phase proliférative. Cette transition est marquée par l'infiltration à la zone infarctée de fibroblastes ainsi que de cellules endothéliales. Une caractéristique importante de la phase proliférative est la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Chen & Frangogiannis, 2013; Frangogiannis, Michael, & Entman, 2000; Willems, Havenith, De Mey, & Daemen, 1994). Ces derniers sont caractérisés par leur expression de l'actine des muscles lisses alpha ( $\alpha$ -SMA) de même que par une augmentation par rapport aux fibroblastes normaux de leurs capacités migratoires, adhésives, sécrétoires et prolifératives (Turner, 2011). Il est important de noter que l'expression d' $\alpha$ -SMA dans ces cellules n'est pas celle habituellement exprimée chez l'adulte, elle est plutôt caractéristique du phénotype foetal. De plus, les myofibroblastes sont importants dans le maintien de la structure du cœur infarci de même que dans la contraction de la zone infarctée. L'angiotensine II ainsi que le TGF- $\beta$ 1 sont deux médiateurs importants dans la réparation cardiaque et dans la fibrogénèse; ils stimulent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Figure 5) ainsi que la synthèse de collagène dans la région infarctée. L'activation et la prolifération des fibroblastes sont également associées à une forte angiogenèse qui a pour but d'alimenter en oxygène et en nutriments la région infarctée qui est métaboliquement très active (Chen & Frangogiannis, 2013; Frangogiannis et al., 2000; Ren, Michael, Entman, & Frangogiannis, 2002). Une fois que la région infarctée est remplie d'ECM, la phase proliférative s'achève et est remplacée par une phase de maturation. Durant cette phase, les fibroblastes deviennent quiescents et entrent en apoptose, certains nouveaux vaisseaux se dotent d'une couche musculaire et des liens entre la matrice extracellulaire se créent induisant une cicatrice à base de collagène dense et solide (Chen & Frangogiannis, 2013; Ren et al., 2002; Zymek et al., 2006).



**Figure 5 : Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes pendant la phase proliférative du remodelage cardiaque**

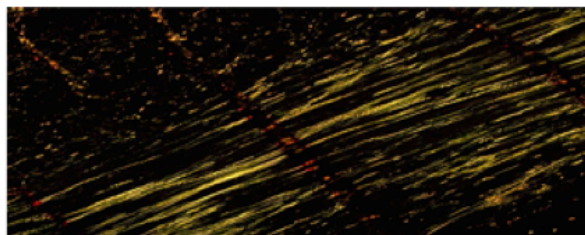
Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2013). Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*, 1833(4), 945-953. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.023

L'accumulation de collagène dans le cœur mène à deux types de fibrose. La fibrose réparatrice lorsque l'accumulation de collagène sert à former une cicatrice au site où les cardiomyocytes morts ont été phagocytés et la fibrose réactive lorsque l'accumulation de collagène se produit dans le cœur en dehors de la région infarctée (Figure 6). La fibrose mène en premier lieu à une raideur cardiaque et à des problèmes d'élasticité qui vont engendrer des problèmes systoliques et diastoliques. Les conséquences électriques de la fibrose proviennent de la fragmentation ou du blocage complet de la conduction électrique. Conséquemment à la fibrose cardiaque, les jonctions communicantes reliant les différentes cellules cardiaques subissent un réarrangement, perturbant ainsi la charge des cardiomyocytes et la propagation physiologiquement anisotropique du courant, deux phénomènes pouvant mener à une conduction discontinue de la propagation électrique dans le cœur (Turner, 2011).

**Normale**

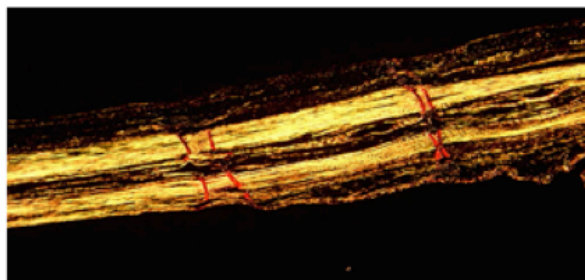


**Myocarde  
Non-Infarcté**



**Fibrose Réactive**

**La région  
cicatricielle**



**Fibrose Réparative**

**Figure 6 : Fibrose réactive vs Fibrose réparatrice :** L'infarctus du myocarde a provoqué une augmentation de l'expression du collagène  $\alpha 1$  (rouge et jaune) dans le myocarde non-infarcté et à la région cicatricielle par rapport à un cœur non infarcté (marquage quasi absent).

Calderone A, données non publiées

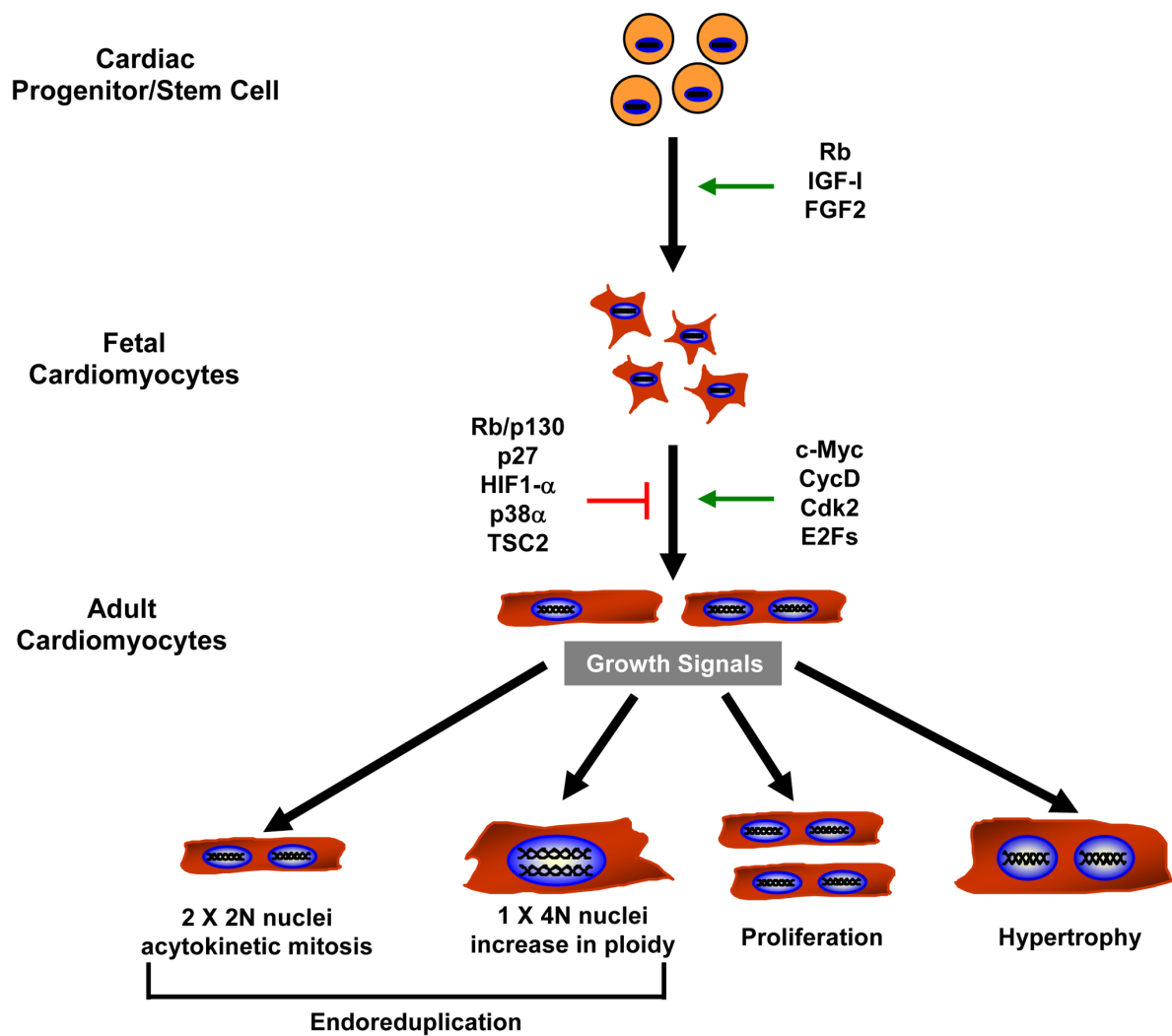
## Régénération cardiaque

Le cœur adulte des mammifères a une capacité très limitée de régénération ce qui en fait un problème médical important puisqu'une mauvaise régénération cardiaque à la suite d'un dommage à celui-ci mène à la cicatrisation du myocarde, à l'insuffisance cardiaque, à l'arythmie et dans certains cas, à la mort (Rumyantsev, 1977; Thom et al., 2006; von Harsdorf, Poole-Wilson, & Dietz, 2004). L'ischémie cardiaque qui se traduit par une mortalité des cardiomyocytes est, sur le plan mondial, une des causes majeures de mortalité chez les individus âgés de 15 à 59 ans. Des études sur le poisson zèbre montre que le cœur de ces derniers a la possibilité de se régénérer via la prolifération des cardiomyocytes (Engel, Hsieh, Lee, & Keating, 2006). Toutefois, certains poissons zèbres possédant une mutation sont incapables de régénération cardiaque, on assiste plutôt à la cicatrisation cardiaque à l'instar des mammifères (Poss, Wilson, & Keating, 2002). Il a été suggéré que chez les mammifères à la suite d'un dommage cardiaque, le processus de prolifération des cardiomyocytes était enclenché, mais que celui-ci était insuffisant et ne suffisait donc pas à la réparation des dommages (Beltrami et al., 2001; Engel et al., 2006). Étudier les processus d'entrées et de sorties du cycle cellulaire des cardiomyocytes chez les animaux capables de régénération cardiaque permettrait possiblement de développer des thérapies de régénération cellulaire.

## Cardiomyocytes

Les cardiomyocytes représentent une population cellulaire hautement spécialisée et structurée ; ces cellules sont régulées par différents systèmes qui se chevauchent à l'occasion. Les cardiomyocytes fœtaux prolifèrent rapidement, mais autour de la période périnatale, cette prolifération cesse. Toutefois, avant la sortie quasi-définitive du cycle cellulaire, ils entreprennent une nouvelle ronde de division cellulaire qu'ils n'achèveront pas. Au cours de celle-ci, la karyokinèse et la cytokinèse vont se dissocier. Il y aura donc synthèse d'ADN et division du noyau, mais la cellule ne se scindera pas en deux, générant de la sorte des cardiomyocytes binucléés (Li, Wang, Bunger, & Gerdes, 1997; Li, Wang, & Gerdes, 1997). En général, les cardiomyocytes adultes ne réentrent pas dans le cycle cellulaire sous l'effet de facteurs de croissance. L'augmentation de la masse cardiaque qui est parfois observée à l'âge adulte est plutôt dû à une augmentation de la taille des cardiomyocytes résultant en une hypertrophie

cardiaque. L'analyse de la prolifération des cardiomyocytes de souris a démontré que la synthèse d'ADN dans ces cellules se produit à deux moments au cours du développement de la souris (Soonpaa, Kim, Pajak, Franklin, & Field, 1996). La première étape se déroule dans les fœtus des souris âgés de douze jours, et la seconde, de quatre à six jours après la naissance. La différence entre ces deux phases de prolifération, c'est qu'au cours de la première, la cytokinèse et la kariokinèse sont associées ; il en résulte la prolifération des cardiomyocytes. La dissociation de ces deux événements dans la deuxième étape mène plutôt à la bi-nucléation de ces cellules. Le processus de division nucléaire sans division cellulaire se nomme mitose acytokinétique (Li, Wang, Bunker, et al., 1997). Chez les souris et les rats, l'accumulation de cardiomyocytes binucléés s'amorce au cours de la 4<sup>e</sup> journée suivant la naissance et atteint 85-90% de la population totale de cardiomyocytes autour de la 3<sup>e</sup> semaine post-natale (Clubb & Bishop, 1984; Soonpaa et al., 1996). Cette binucléation indiquant la sortie du cycle cellulaire de ces cellules s'accompagne d'une diminution des régulateurs pro-mitotiques et d'une augmentation de Rb (protéine du rétinoblastome) et des CdkI (cyclin dépendant kinase inhibitors) p21 et p27 (Koh et al., 1998; Poolman, Gilchrist, & Brooks, 1998; Walsh & Perlman, 1997; Wang & Nadal-Ginard, 1995). Tous ces changements favorisent l'inhibition de la prolifération des cardiomyocytes. La raison physiologique pour laquelle ces cellules deviennent binucléées n'est pas claire, mais il semblerait que cette binucléation soit une adaptation de la cellule lui permettant de doubler sa production d'ARN et ainsi pouvoir synthétiser davantage de protéines. Plusieurs groupes ont démontré la présence de cellules souches ayant la capacité de se différencier en cardiomyocytes, toutefois la capacité de ces cellules à régénérer le cœur à la suite d'un dommage au cœur est remise en question (Figure 7) (Anversa, Leri, Kajstura, & Nadal-Ginard, 2002; Dimmeler, Zeiher, & Schneider, 2005; Rubart & Field, 2006). Étant donné leur capacité limitée de régénération, les cardiomyocytes ne suffisent pas à la régénération cardiaque à la suite d'un dommage myocardial. Chez les mammifères, l'échec du rétablissement de la fonction cardiaque normale à la suite d'un dommage à celui-ci est en partie attribuable à la capacité limitée des cellules souches cardiaques et des cardiomyocytes à se reproduire afin de générer de nouveaux cardiomyocytes. Cette situation n'est pas commune à tout le règne animal puisque les cardiomyocytes de certaines espèces ont la possibilité de se régénérer, c'est en autre le cas des poissons zèbres. Les mécanismes expliquant les différentes capacités régénératives d'une espèce à l'autre ne sont toutefois pas encore connus (Ahuja, Sdek, & MacLellan, 2007).



**Figure 7 : Contrôle du cycle cellulaire des cardiomyocytes et de ses progéniteurs**

Ahuja, P., Sdek, P., & MacLellan, W. R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev*, 87(2), 521-544. doi: 10.1152/physrev.00032.2006

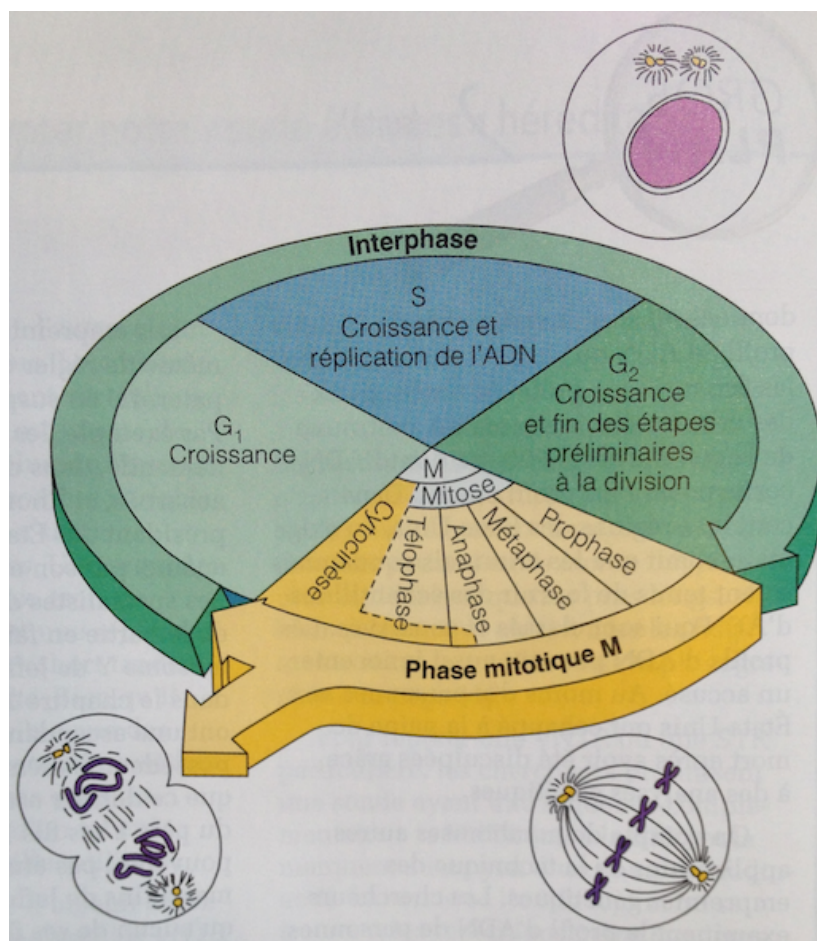


Un des problèmes limitant l'étude de la prolifération des cardiomyocytes chez les mammifères est l'absence de modèle adéquat permettant d'étudier leur cycle cellulaire. Certaines lignées cellulaires sont utilisées *in vitro* pour étudier certains aspects des cardiomyocytes mais aucune d'entre elles n'ont le même développement que ces derniers. C'est une des raisons qui pousse les scientifiques à utiliser des cultures primaires de cardiomyocytes fœtaux et néonataux, et ce, même s'il existe des différences majeurs entre ces derniers et les cardiomyocytes adultes post-mitotiques. Un des problèmes concernant l'utilisation des cardiomyocytes fœtaux et néonataux pour la compréhension de la régulation du cycle cellulaire des cardiomyocytes adultes est que, contrairement à ces derniers, ces cellules possèdent une certaine capacité proliférative ainsi que des activateurs endogènes du cycle cellulaire. Il est donc important d'interpréter avec précaution les résultats provenant de la mise en culture de cardiomyocytes fœtaux et néonataux. L'isolation des cardiomyocytes adultes pose également problème puisque ces derniers sont difficilement cultivables sur de longues périodes et ils ont tendance à se dédifférencier et à regagner leur potentiel prolifératif, bref aucun modèle n'étant parfait il faut choisir son modèle d'étude avec précaution (Claycomb & Bradshaw, 1983). Finalement, les modèles *in vivo* de souris transgéniques permettent également l'étude des cardiomyocytes, toutefois ces modèles doivent être bien caractérisés avant d'en tirer des conclusions (Ahuja et al., 2007).

## **Le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire comprend 2 étapes majeures, l'interphase pendant laquelle la cellule croît et poursuit la majeure partie de ses activités, et la division cellulaire, également appelée phase mitotique. Au cours de la division cellulaire, une cellule mère va donner naissance à 2 cellules filles possédant des copies identiques de son matériel génétique. L'interphase quant à elle, est la période pendant laquelle une cellule ne se divise pas. Durant cette phase, elle va assurer les fonctions normales essentielles à sa survie, mais elle va également se préparer pour sa prochaine division, donc bien que les cellules en interphase ne subissent pas beaucoup de changements morphologiques comparativement à une cellule mitotique, elles sont tout de même métaboliquement très actives. L'interphase se divise en 3 sous-phases nommées G1, S et G2 (Figure 8). Pendant ces 3 sous-phases, la cellule est en croissance, elle y produit des protéines et des organites. La reproduction de la chromatine est quant à elle limitée à la sous-phase S. La sous-phase G1 est la plus variable dans le temps, dépendamment du type cellulaire en question,

elle peut durer de quelques minutes chez les cellules qui se divisent souvent à quelques années chez les cellules qui se divisent peu. À l'exception du commencement de la réplication des centrioles qui se produit vers la fin de cette sous-phase, très peu d'activités relatives à la réplication cellulaire y sont impliquées. Les cellules sont plutôt occupées à synthétiser les protéines particulières aux tissus auxquels elles appartiennent. La réplication de l'ADN se déroule au cours de la phase S, c'est grâce à cette duplication du matériel génétique qu'on obtient deux cellules filles identiques à la fin du cycle cellulaire. La dernière étape de l'interphase est G<sub>2</sub>. Au cours de cette sous-phase, les protéines nécessaires à la division cellulaire sont synthétisées puis acheminées aux sites appropriés. En fin de G<sub>2</sub>, la réplication des centrioles qui avait débuté en G<sub>1</sub> est achevée (Marieb, 2005).



**Figure 8 : Cycle cellulaire**

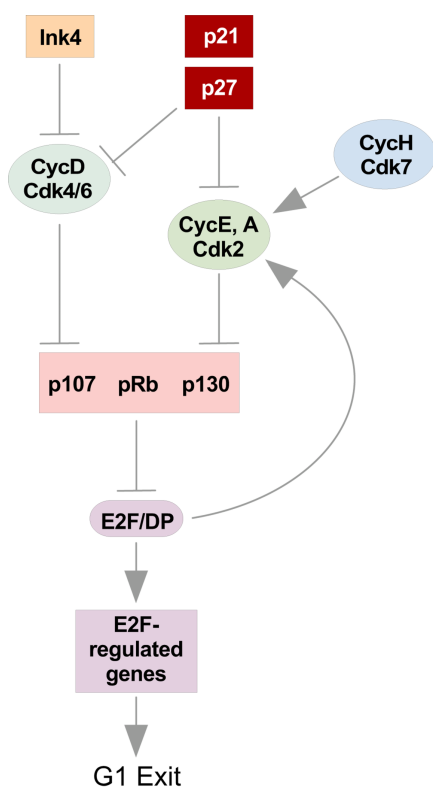
Marieb, E. N. (2005). *Anatomie et physiologie humaines*. (3e éd.<sup>e</sup> éd.). Saint-Laurent, Qué.: Éd. du Renouveau pédagogique. Page 100

Dans les cellules non sexuelles, la division cellulaire est divisée en 2 étapes, la division du noyau (mitose) et la division du cytoplasme (cytocinèse). La mitose est l'étape au cours de laquelle l'ADN préalablement répliqué dans la cellule mère est divisé entre les 2 cellules filles. Cette étape contient quatre phases continues, soit la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Ces 4 étapes qui se déroulent sans pause sont généralement d'une durée globale d'une heure ou moins chez l'humain. À la fin de l'anaphase, la cytocinèse se met en marche. Un anneau contractile formé de filaments d'actine scinde la masse cytoplasmique en deux formant ainsi deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère (Marieb, 2005).

Ce ne sont pas toutes les cellules qui se divisent, certaines cessent définitivement de se diviser, alors que d'autres ne font que prendre une pause, ces cellules sont dites en phases G<sub>0</sub>. Plusieurs facteurs peuvent intervenir afin de déclencher le processus de division cellulaire, deux groupes de protéines jouent un rôle primordial dans la capacité des cellules à passer à travers la phase S et à entamer la mitose. Il s'agit des cyclines et des kinases cycline-dépendantes (Cdk), ces dernières sont activées à la suite de la liaison avec certaines cyclines. La concentration des cyclines n'est pas constante au cours du cycle cellulaire alors que celle des Cdk est stable tout au long de celui-ci. Lors de l'interphase, à la suite des signaux précis, il va y avoir accumulation de cyclines nouvellement formées. Celles-ci vont s'associer spécifiquement à des Cdk et, ainsi, entamer des cascades enzymatiques qui vont résulter en la phosphorylation d'histones et d'autres protéines essentielles à l'aboutissement de la division cellulaire. Une fois que les cyclines ont accompli leurs tâches vers la fin de la mitose, elles sont dégradées par des complexes enzymatiques nommés protéasomes. Un autre complexe protéique est très important au processus de division cellulaire ; il s'agit du facteur de promotion de la phase mitotique (MPF). Celui-ci doit être présent en quantité suffisamment grande lors de G<sub>2</sub> pour indiquer à la cellule qu'elle peut quitter G<sub>2</sub> et entrer dans la phase mitotique. Ceci constitue donc un des nombreux points de contrôle présents dans la cellule lui permettant de passer à travers la réplication cellulaire avec le moins d'embûches possibles (Marieb, 2005).

## L'expression et le rôle des régulateurs du cycle cellulaire durant le développement cardiaque

Comme mentionné précédemment, les cyclines et les Cdk figurent parmi les protéines clés qui régulent le cycle cellulaire. Afin d'assurer le bon déroulement du cycle cellulaire, les cellules ont développé des points de vérification au cours desquels l'activité des complexes cycline-Cdk est contrôlée. Ces complexes essentiels à certains événements du cycle cellulaire sont activés par CAK (cycline H/Cdk7) et inhibés par les inhibiteurs des Cdk (CdkI). À la fin de la phase G1 du cycle cellulaire, Cdk4 et Cdk6 s'assemblent avec les cyclines D1, D2 ou D3 afin de former des complexes enzymatiques actifs (Sherr, 1994). Ces complexes actifs vont phosphoryler des protéines de la famille des Rb (Rb, p107, p130) entraînant ainsi la relâche des facteurs de transcription E2F. La cycline E est surtout exprimée au cours de la transition de la phase G1 à S. Au cours de cette transition, elle va former un complexe enzymatique avec Cdk2 afin d'accélérer la phosphorylation des protéines de la famille Rb. Sous sa forme hypo-phosphorylée, Rb est lié au complexe E2F. La phosphorylation de Rb inhibe la liaison de ce dernier au complexe E2F, ce qui permet la sortie du cycle cellulaire des cardiomyocytes (Figure 9). Le complexe formé de Cdk2 et de la cycline A joue un rôle majeur dans la phase S, et la cycline B et Cdc2 sont requis durant la phase G2/M. Les facteurs de transcription E2F sont responsables de l'expression de gènes impliqués dans la sortie de G1 ainsi que dans la synthèse d'ADN (Ahuja et al., 2007; Nevins, 1992).



**Figure 9 : Sortie du cycle cellulaire des cardiomyocytes**

Ahuja, P., Sdek, P., & MacLellan, W. R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev*, 87(2), 521-544. doi: 10.1152/physrev.00032.2006

Dans le cœur adulte des mammifères, la majorité des cardiomyocytes ont atteint leur stade final de différenciation. Cette différenciation terminale implique deux phénomènes, leur retrait permanent du cycle cellulaire ainsi que l'augmentation de gènes spécifiques au tissu cardiaque. Par exemple, les cardiomyocytes fœtaux et néonataux des rongeurs expriment la B-MHC (la myosine des chaînes lourdes bêta) ainsi que l'actine squelettique, mais au cours du développement, une transition prend place et ces gènes sont diminués en faveur d'une augmentation de l'actine cardiaque et de la myosine des chaînes lourdes alpha dans les cardiomyocytes adultes (Subramaniam et al., 1991). Afin qu'un type cellulaire puisse être caractérisé de terminalement différencié, la majorité de ses cellules ne doivent pas réentrer dans le cycle cellulaire en réponse à un facteur pro-mitotique ou à un stress physiologique normal. Chez l'humain, des études ont démontré qu'à la suite d'un dommage cardiaque, de 1 à 4% des cardiomyocytes peuvent réentrer dans le cycle cellulaire. Toutefois, bien que ces cellules réentrent dans le cycle cellulaire, le pourcentage de celles-ci qui achèvent le cycle et qui prolifèrent n'est pas connu (Beltrami et al., 2001). Le triton est l'une des espèces chez qui la régénération myocardiale a été admise par la communauté scientifique. Chez ces amphibiens, il a été démontré que la cytokinèse se produit dans les cardiomyocytes adultes et que ce phénomène est plus probable dans la population de cardiomyocytes mononucléés par rapport à ceux bi/polynucléés (Matz, Oberpriller, & Oberpriller, 1998). Lorsque les cardiomyocytes binucléés de triton entrent dans le cycle cellulaire, il en résulte plus souvent qu'autrement un échec de la cytokinèse et la division du noyau, générant ainsi des cardiomyocytes ayant un nombre variable de noyau. Toutefois, bien que l'humain soit l'une des espèces ayant le plus de cardiomyocytes mononucléés, la régénération cardiaque suivant un infarctus ne suffit pas à réparer les dommages subis par le tissu cardiaque (Ahuja et al., 2007).

## **Cellules souches**

Il y a deux caractéristiques qui distinguent les cellules souches des autres cellules de l'organisme. En premier lieu, elles sont des cellules non spécialisées qui ont la possibilité de donner naissance à d'autres cellules souches, et ce, même après une longue période d'inactivité. Deuxièmement, sous certaines conditions physiologiques, pathologiques ou expérimentales, elles peuvent donner naissance à des cellules spécifiques à certains tissus (Health, 2002). Elles peuvent donc reconstituer leur propre population cellulaire ou produire des cellules empruntant des voies de signalisation variées (Campbell & Reece, 2007). Dépendamment de leur localisation, elles peuvent passer à travers le cycle cellulaire régulièrement afin de remplacer les cellules endommagées / vieilles comme c'est le cas dans l'intestin, ou elles peuvent se reproduire plus rarement comme dans le cœur sous certaines conditions. Les cellules souches sont essentielles au développement du corps humain. Chez l'embryon âgé de trois à 5 jours, le blastocyte, ces cellules vont se diviser et se différencier de façon à donner naissance à toutes les lignées cellulaires présentes chez l'homme adulte (Health, 2002). L'isolation et la mise en culture des cellules souches embryonnaires permettent de générer une réserve inépuisable de cellules étant donné leur potentiel illimité de division. Ces cellules sont qualifiées de totipotentes puisqu'elles sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires. À l'âge adulte, l'être humain est aussi doté de cellules souches, mais ces dernières sont pluripotentes étant donné qu'elles ne peuvent pas donner naissance à tous les types cellulaires, seulement certains (Campbell & Reece, 2007). Étant donné leur habilité régénérative, les cellules souches représentent un bassin thérapeutique inépuisable. En améliorant notre compréhension de ces cellules, il serait possiblement réalisable de remplacer les cellules bêtas-pancréatiques d'un patient souffrant de diabète de type 1 ou encore de remplacer les cardiomyocytes d'un patient ayant subi un infarctus du myocarde. À l'heure actuelle, les études portant sur les cellules souches s'intéressent aux mécanismes permettant l'auto-régénération, la différenciation de ces cellules et aux caractéristiques qui les différencient des autres cellules. Ces notions pourraient en premier lieu aider à comprendre via quels mécanismes des cellules saines deviennent cancéreuses et en deuxième lieu comment il serait possible de renverser ce processus (Health, 2002).

### **Cellules progénitrices cardiaques résidentes du cœur adulte**

Les scientifiques ont découvert plusieurs cellules progénitrices cardiaques capables de se différencier en cardiomyocytes. Toutefois, lorsque ces cellules se sont différenciées en cardiomyocytes, elles ne peuvent que se diviser de trois à quatre fois avant de se retirer définitivement du cycle cellulaire (Ahuja et al., 2007; Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003). La première cellule souche cardiaque endogène à avoir été découverte et ayant la possibilité de se différencier *in vivo* en cellule phénotypiquement identique aux cardiomyocytes était  $\text{Lin}^-$ ;  $\text{c-kit}^+$ . L'absence de Lin dans une cellule indique que cette dernière n'exprime pas de marqueurs spécifiques à une lignée cellulaire, tandis que c-kit est un récepteur transmembranaire tyrosine kinase utilisé comme marqueur des cellules souches. Ces cellules  $\text{Lin}^-$ ;  $\text{c-kit}^+$  pouvaient également se différencier en cellules de muscles lisses et en cellules endothéliales, preuve de leur caractère pluripotent. À la suite d'un infarctus du myocarde, l'injection de cellules  $\text{c-kit}^+$  à la bordure de la zone infarctée a mené à des bandes de régénérations myocardiales, a contribué à la population de cellules endothéliales et de muscles lisses et à ainsi participer à l'amélioration de la fonction cardiaque (Beltrami et al., 2003). Ces cellules sont également présentes dans le cœur humain adulte. Toutefois malgré leur présence, une régénération significative suivant un infarctus du myocarde n'est pas observée (Urbanek et al., 2003; Urbanek et al., 2005). Ces cellules ne répondent donc pas aux facteurs de croissance locaux ou elles sont incapables de migration et de différenciation à la suite d'un infarctus.

## Nestine

Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire de classe VI découverte initialement dans les cellules souches du rat lors du développement du système nerveux central. C'est une protéine de 240kDa qui contrairement aux autres classes de protéines filamenteuses intermédiaires est incapable de former des homodimères dû à sa courte queue NH<sub>2</sub>-terminale. Conséquemment, dépendamment du type cellulaire dans lequel nestine est exprimée, celle-ci va s'associer à d'autres protéines filamenteuses intermédiaires telles que vimentine et desmine et ainsi former des hétérodimères (Calderone, 2012). Nestine est impliquée dans le remodelage du cytosquelette et est particulièrement présente dans les cellules souches qui se différencient. À la suite de la différenciation finale de la cellule, nestine va être remplacée par des protéines filamenteuses intermédiaires spécifiques au tissu dans lequel elle se trouve, soit par des neurofilaments dans les neurones, par la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) dans les astrocytes et par desmine dans les muscles. (Pallari et al., 2011) Ainsi, chez les adultes, nestine n'est pas présente dans les tissus mis à part dans les cellules souches, les cellules progénitrices et les tissus en régénération (Berry, Andruszkiewicz, Chun, & Hong, 2013). Chez le rat, les 5945 paires de bases qui forment le gène de nestine contiennent 5 exons et 4 introns. L'expression de nestine est contrôlée par le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>e</sup> intron dépendamment du type cellulaire dans lequel elle est exprimée. Dans les cellules souches neurales progénitrices en prolifération, nestine est exprimée via des amplificateurs situés dans le second intron. Lors de la myogénèse et de l'angiogénèse dans le muscle squelettique et les cellules endothéliales, nestine est une fois encore exprimée, mais cette fois-ci via le 1<sup>er</sup> intron. Nestine a été identifiée pour la première fois dans le cœur en développement de souris par Kachinsky et ses collègues (Kachinsky, Dominov, & Miller, 1995). L'expression de cette dernière était transitoire et limitée à la période mi-embryonnaire du développement de la souris. Par la suite, des analyses ont montré que sous la forme d'ARN messenger et sous la forme protéique, nestine dans le cœur est localisée dans les cardiomyocytes ventriculaires et atriaux. Bien que sa localisation soit connue, son rôle exact demeure incertain. Toutefois plusieurs études semblent attribuer un rôle prolifératif et migratif à nestine. Il n'est donc pas étonnant de voir nestine présente dans plusieurs cancers dont le cancer du pancréas, du sein, de la prostate. Dans ce dernier, la motilité des cellules cancéreuses est contrôlée par nestine, et son inhibition entraîne un ralentissement de la migration cellulaire (Pallari et al., 2011). Le groupe d'Anversa a

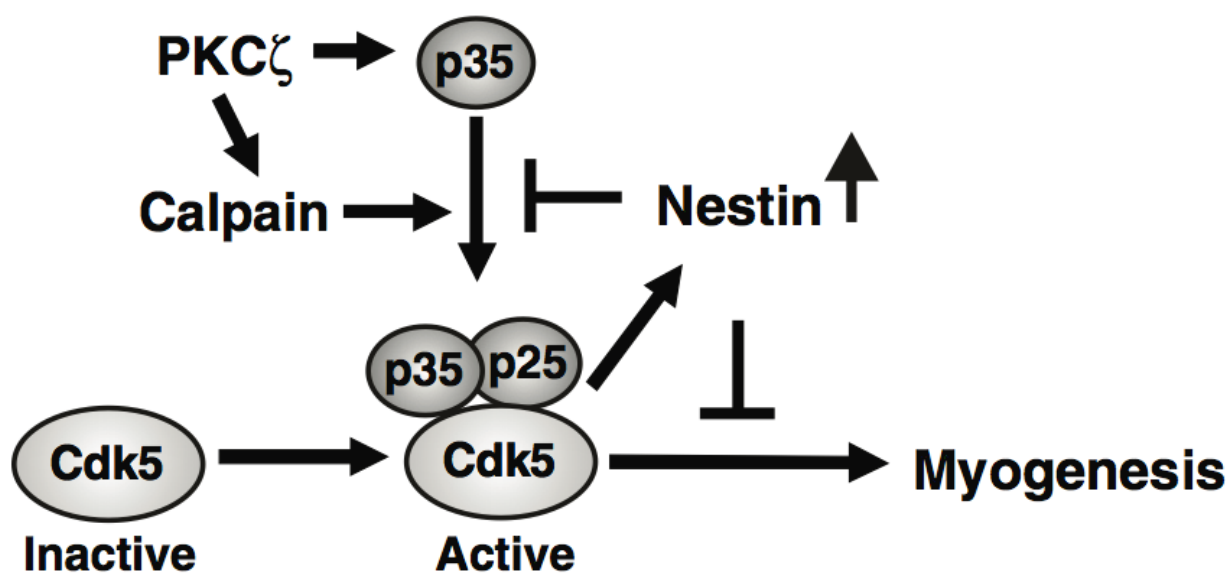


démontré chez l'humain la présence de nestine dans le cœur à la suite d'une transplantation cardiaque. Les cellules du cœur transplanté exprimant nestine coexprimaient des facteurs de transcription cardiaques essentiels au développement du cœur tels que GATA 4, ce qui laisse sous-entendre que le cœur humain aurait possiblement une réserve de cellules nestine <sup>(+)</sup> impliquée dans la régénération et la réorganisation cardiaque (Quaini et al., 2002). En 2008, Scobioala et ses collègues ont démontré la présence de nestine sous la forme d'ARN messenger dans le cœur humain en santé et ont noté une augmentation de cette dernière à la suite d'un infarctus du myocarde dans la partie non-infarctée du ventricule gauche ainsi que dans la région cicatricielle, comparativement à un myocarde en santé (Scobioala et al., 2008). Le mécanisme exact par lequel nestine est contrôlé n'est pas bien connu, toutefois plusieurs études ont démontré que nestine est un substrat pour la cyclin-dépendent kinase 5 (Cdk5) (Liu et al., 2013).

## **Cdk5**

Cdk5 est un régulateur important du développement neuronal ainsi que du fonctionnement neuronal normal. L'inhibition de son activité peut mener à une diminution de la dégradation de nestine laissant ainsi croire que Cdk5 joue un rôle dans la régulation de nestine (Liu et al., 2013). Chez les souris Cdk5 déficiente (KO), une mortalité périnatale associée à une mauvaise corticogénèse démontre toute l'importance de Cdk5 durant l'embryogenèse (Pallari et al., 2011). De plus, une déficience en Cdk5 affecte le tissu musculaire en inhibant la myogenèse (Lazaro et al., 1997). Dans les myoblastes en différenciation, l'activité de Cdk5 est régulée par la protéine kinase C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ). Cette dernière phosphoryle le p35 qui est la protéine activatrice de Cdk5 et elle agit également en activant la calpaïne. Ces deux activités régulées par la PKC $\zeta$ , mène à la génération de p25 qui est un activateur de Cdk5 résistant à la dégradation. À la suite de sa génération, p25 va former un complexe avec p35 qui va permettre de maintenir une activation adéquate de Cdk5 pendant le processus de différenciation des myoblastes (Figure 10). De plus, il a été démontré que Cdk5 sous sa forme active permet de réguler la réorganisation des filaments intermédiaires nestine lors de la fusion des myoblastes. Cette relation entre nestine et Cdk5 est complexe puisqu'en cas de stress oxydatif, nestine assure la survie cellulaire en servant d'échafaudage dynamique pour le complexe Cdk5/p35, dirigeant ainsi son activité et sa localisation cellulaire.

La surexpression de nestine mène à l'inhibition de la myogenèse, de sorte que, chez les myoblastes sur-exprimant nestine, la différenciation vers des myotubes est ralentie. Le contraire est aussi vrai, l'ablation de nestine dans les myoblastes accélère la différenciation de ces derniers en myotubes. Étant donné que nestine occupe un rôle important dans la prolifération, ceci va de pair avec le principe selon lequel une augmentation dans la différenciation mène à une diminution dans la prolifération et vice versa. Afin de ralentir la myogenèse, nestine agit sur Cdk5 en contrôlant la génération du P25. C'est une interaction complexe puisque Cdk5 assure également le maintien de la stabilité de nestine durant la myogenèse. Cdk5 régule donc nestine qui lui sert d'inhibiteur et d'échafaudage (Pallari et al., 2011). Toutefois, il est important de noter que dépendamment du type cellulaire, l'interaction entre nestine et Cdk5 peut varier.



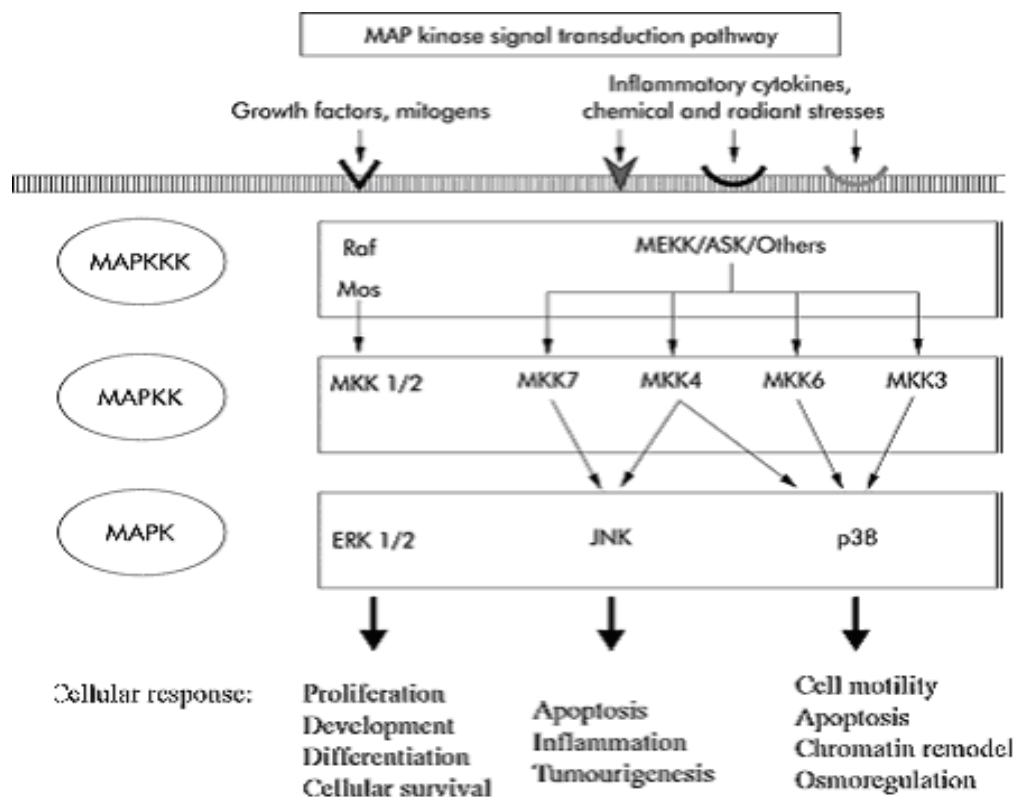
**Figure 10 : Modèle de la régulation des voies de signalisation de Cdk5 par nestine dans les myofibroblastes en différenciation**

Pallari, H. M., Lindqvist, J., Torvaldson, E., Ferraris, S. E., He, T., Sahlgren, C., & Eriksson, J. E. (2011). Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol Biol Cell*, 22(9), 1539-1549. doi: 10.1091/mbc.E10-07-0568

## Voies de signalisation

### Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

Les cellules répondent aux stimuli extracellulaires en enclenchant des réponses intracellulaires telle que la cascade signalétique qui mène à l'activation des MAPKs. Toutes les cellules eucaryotes possèdent des voies MAPKs qui contrôlent plusieurs activités cellulaires dont l'expression génique, la mitose, le métabolisme, la motilité, la survie, l'apoptose ainsi que la différenciation. Il existe cinq différents groupes de MAPKs : les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERKs 1 et 2), les kinases amino-terminale c-Jun (JNKs 1, 2 et 3), les isoformes de p38 (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), ERK 3 et 4 et finalement ERK5 (Roux & Blenis, 2004). Les MAPKs les plus étudiées sont ERK 1/2, JNK et les p38kinases. Bien que chaque MAPK possède des caractéristiques qui lui sont propres, certaines ont été conservées au cours de l'évolution à travers les différentes voies MAPKs. Ainsi, chaque voie MAPK est composée de 3 MAPKs. Il s'agit d'une MAPK, une MAPK kinase (MAPKK) et d'une MAPKK kinase (MAPKKK). Les MAPKKK sont des kinases sérines/thréonines activées par phosphorylation ou par interaction avec une petite protéine G de la famille Ras/Rho en réponse à un signal extracellulaire (Dan, Watanabe, & Kusumi, 2001; Kolch, 2000). L'activation de la MAPKKK mène à l'activation et à la phosphorylation de la MAPKK, cette dernière phosphoryle ensuite la MAPK sur des résidus thréonine et tyrosine de la boucle d'activation du sous-domaine VIII de la MAPK (Figure 11). Les différentes fonctions assurées par les MAPKs sont atteintes via la phosphorylation de plusieurs substrats dont les phospholipases, les facteurs de transcription, les protéines cytosquelettiques etc. Les MAPKs assurent également la phosphorylation et l'activation de protéines kinases activées par les MAPKs (MKs), ces dernières assurent une autre étape d'amplification enzymatique dans la cascade des MAPKs. La famille des MK comprend un grand nombre de kinase dont les kinases S6 ribosomiques (RSKs), les mitogen and stress activated kinases (MSKs), les kinases interagissant avec les MAPK (MNKs), les kinases activées par les MAPKs (MK2, MK3, MK5). Ces kinases assurent un large spectre de fonctions biologiques en réponse à des stimuli mitogéniques et au stress.



**Figure 11 : Activation des voies MAPKs les plus étudiées**

Bel Hadj, S. (2004). *Les protéines kinases C activées par les esters de phorbol modulent la croissance des cellules cardiaques*. (Thèse (M Sc ), Université de Montréal, Montréal). Accessible par CaQMU. (000484492)

## **P38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPKs)**

Les p38 MAPKs sont des molécules signalétiques clés qui participent à la réponse des cellules aux stress environnementaux. Elles régulent plusieurs cytokines pro-inflammatoires et sont ainsi impliquées dans la pathogénicité de plusieurs conditions impliquant une réaction inflammatoire, tel que athérosclérose. Depuis les deux dernières décennies, plusieurs laboratoires se sont intéressés à l'inhibition des p38 MAPKs afin d'atténuer les effets néfastes de l'inflammation dans certaines maladies. Autrefois, l'inhibition des p38 MAPKs était surtout étudiée dans le cadre de la maladie de Crohn et de l'arthrite rhumatoïde. Toutefois une efficacité clinique décevante et des effets secondaires importants ont eu raison de ces études. Plus récemment, l'inhibition des p38 MAPKs a démontré des résultats cliniques intéressants dans l'athérosclérose ainsi que dans les

maladies pulmonaires obstructives chroniques (Fisk, Gajendragadkar, Maki-Petaja, Wilkinson, & Cheriyan, 2014). Il a été démontré que, dans plusieurs types cellulaires, les p38 MAPKs induisent la sortie du cycle cellulaire ainsi que la différenciation cellulaire, incluant la différenciation des cellules P19 en cardiomyocytes. Sous sa forme active, P38 phosphoryle en aval des molécules signalétiques responsables de provoquer la différenciation ainsi que l'hypertrophie des cardiomyocytes. P38 possède 4 isoformes, p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ . L'isoforme le plus retrouvé dans le cœur est le p38 $\alpha$ , les isoformes p38 $\beta$  et p38 $\gamma$  sont également présents mais en quantité moindre, tandis que le p38 $\delta$  ne se retrouve simplement pas dans le cœur. Chez les mammifères, le cœur a une possibilité très limitée de régénération, les p38 MAPKs permettent de contrôler le cycle cellulaire des cardiomyocytes. En effet, p38 empêche la division des cardiomyocytes. Sous sa forme active, l'expression de p38 est inversement proportionnelle à la croissance cardiaque durant le développement et sa surexpression dans des cardiomyocytes fœtaux bloque leur différenciation in vitro. En inhibant spécifiquement l'activité de p38 $\alpha$ , il est également possible d'augmenter le nombre de cardiomyocytes néonataux en mitose. De plus, en combinant l'inhibition de p38 et la stimulation de facteurs de croissance, il est possible d'induire la cytokinèse dans les cardiomyocytes adultes, ce qui nous indique que l'effet négatif de p38 sur la prolifération des cardiomyocytes est réversible et que des cellules ayant subi la mitose et étant différenciées sont capables de prolifération (Engel et al., 2005). MKK3, MKK4 et MKK6 sont trois kinases en amont de p38 responsables de son activation. L'inhibition de p38 est assurée par de nombreuses phosphatases, mais l'activité de ces phosphatases n'est pas limitée à p38 puisqu'elles déphosphorylent également ERK et JNK. Les cibles en aval de p38 sont d'autres kinases ou des facteurs de transcriptions tels que ATF-2 (activating transcription factor 2) et MEF2 (myocyte enhancing factor 2) (Figure 12). MK2 est une des nombreuses kinases activées par la phosphorylation de p38 (Hommes, Peppelenbosch, & van Deventer, 2003).

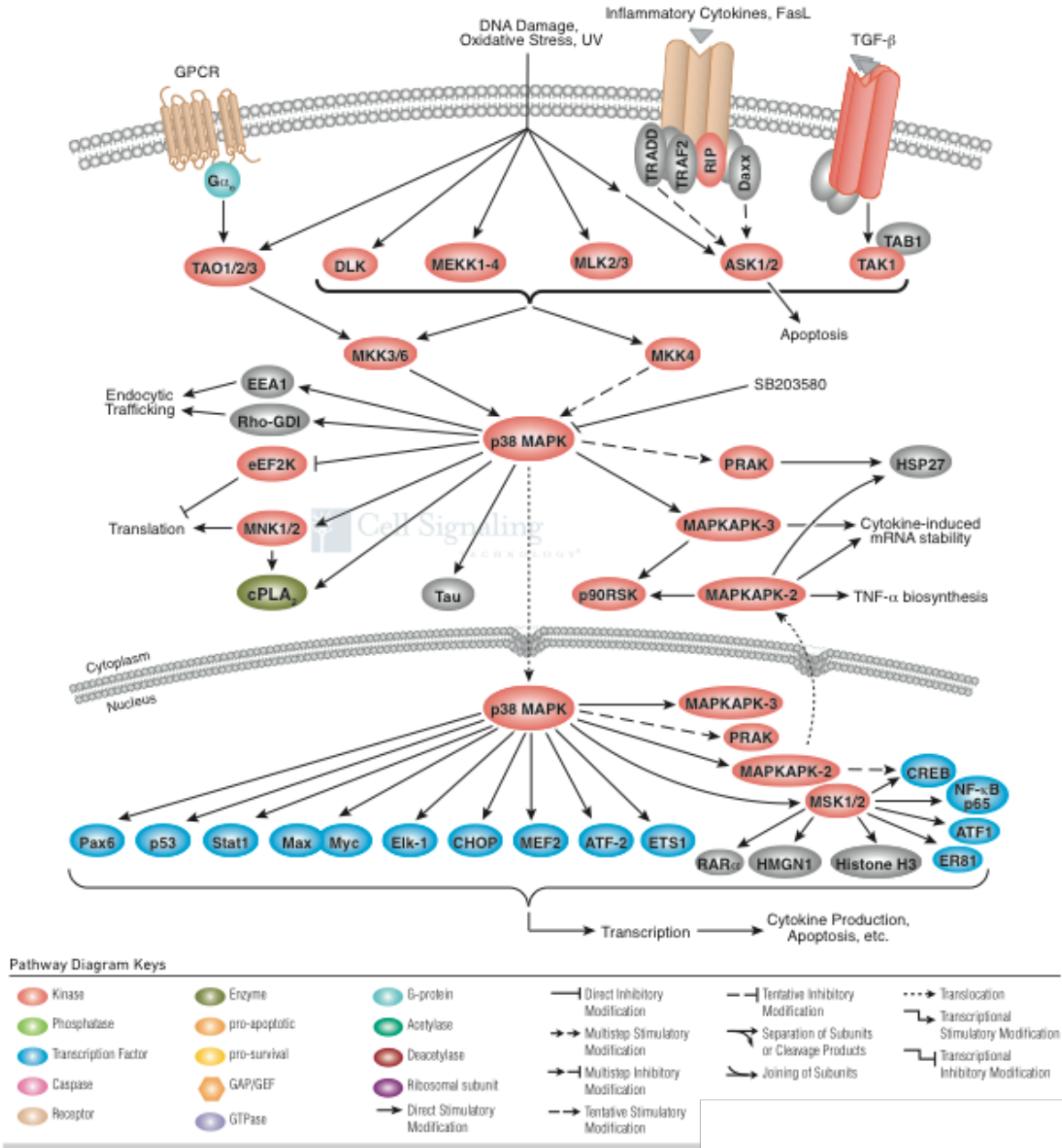


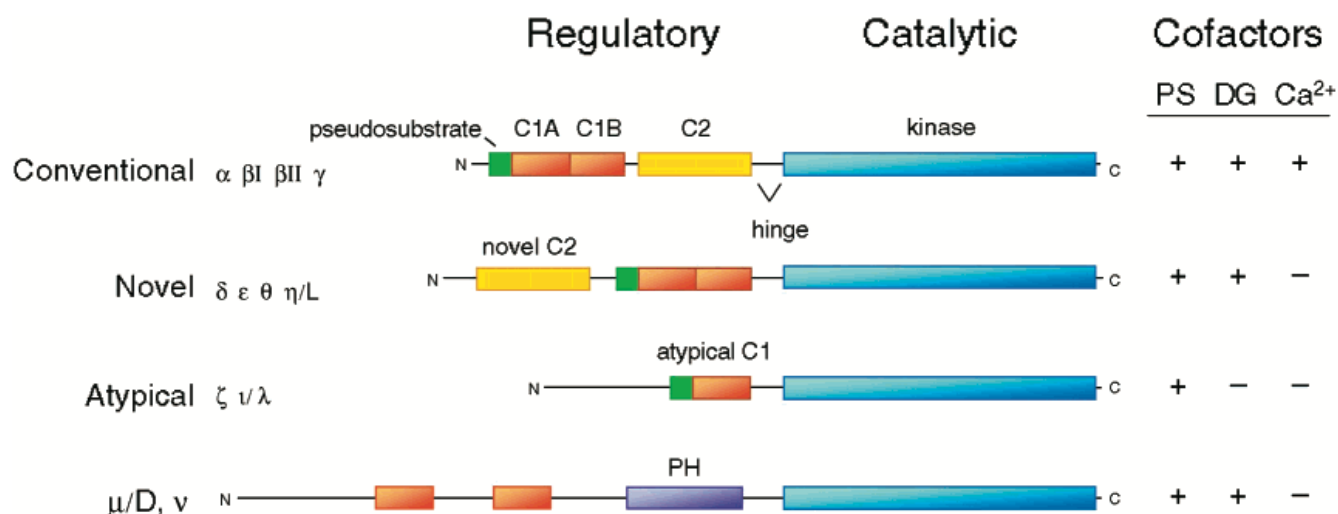
Figure 12 : Voies de signalisation de la p38 MAPK

Cell signaling technology

## **Protéines kinases C :**

La communication entre cellules se fait via différents mécanismes. Une des stratégies qui permet la diffusion d'un message provenant d'un récepteur membranaire est l'utilisation de seconds messagers. Ceux-ci interagissent avec des protéines intracellulaires et enclenchent des réponses cellulaires à la suite de l'interaction d'un récepteur membranaire avec un ligand. Les protéines kinases jouent un rôle essentiel dans la transmission de signaux via les seconds messagers (Srivastava, Anand-Srivastava, & SpringerLink (Service en ligne), 2008). La découverte dans les années 1980 que les protéines kinases C (PKC) sont les récepteurs pour les phorbols esters a propulsé les PKC au premier plan de la recherche. Les phorbols esters sont des substances pharmacologiques classées parmi les promoteurs tumoraux et ils sont largement utilisés en laboratoire afin d'activer certaines familles de PKC. Les nombreuses études effectuées durant ces années ont permis de démontrer que les PKC occupent une importance capitale dans la signalisation cellulaire. Le dogme concernant l'activation de ces enzymes était que la génération du second messenger lipidique diacylglycérol (DAG) menait à la translocation de la majorité des PKC du cytosol à la membrane plasmique où elles devenaient actives. Le DAG constitue l'agoniste naturel de la région C1 des PKC (voir figure 13). Toutefois, cette translocation ne constitue qu'une seule des étapes menant à l'activation des PKC. Non seulement il doit y avoir liaison du DAG au site allostérique des PKC, mais cette enzyme doit également traverser une série de phosphorylation afin de devenir active. La 3<sup>e</sup> étape menant à l'activation des PKC est l'interaction entre ces dernières et des protéines d'échafaudages qui vont acheminer les PKC à proximité de leurs régulateurs et substrats (Newton, 2001). Les protéines kinases C (PKC) sont des protéines kinases multifonctionnelles indépendantes des nucléotides cycliques qui phosphorylent les résidus sérines et thréonines de plusieurs protéines cibles. Ces protéines sont des enzymes séparées en différents groupes selon leur structure, leur fonction ainsi que par les différents facteurs qui les activent. Les PKC sont divisées en trois groupes principaux, les PKC conventionnelles nécessitant du calcium et du diacylglycérol (DAG) afin d'être activées ; il s'agit des isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$  II et  $\gamma$ . Les PKC nouvelles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  et  $\theta$ ) nécessitent uniquement le DAG, tandis que les PKC atypiques ( $\zeta$ ,  $\lambda$  et  $\iota$ ) ne nécessitent ni le calcium, ni le DAG pour leur activation. Toutes les PKC possèdent un domaine d'interaction phosphatidylsérine (PS) afin d'interagir avec la membrane cellulaire. La structure générale des PKC consiste en un domaine catalytique situé en C-terminale et d'un domaine régulateur en N-terminale, chacun de ces

domaines sont constitués de régions conservées (C1-C4) et de régions variables (V0-V5) (Figure 13). (Webb, Hirst, & Giembycz, 2000)



**Figure 13 : Structure des PKC et leurs facteurs d'activation**

Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 101(8), 2353-2364.

### Pseudosubstrat

Le pseudosubstrat est une petite séquence d'acides aminés qui se lie au PKC dans la cavité de liaison du substrat, maintenant ainsi la PKC dans un état inactif. L'activation des PKC est accompagnée par la relâche du pseudosubstrat (Orr, Keranen, & Newton, 1992). Ce dernier est résistant à la protéolyse lorsque les PKC sont inactives. Toutefois lorsque celles-ci passent à travers leur activation, le pseudosubstrat devient hautement susceptible à la protéolyse. La façon dont le pseudosubstrat est relâché n'est pas encore bien connue. Toutefois, des études énergétiques ont démontré la possibilité que cette relâche soit due à une relâche d'énergie se produisant lorsque les PKC se lient à la membrane plasmique (Johnson, Giorgione, & Newton, 2000) (Newton, 2001).



## Phosphorylation des protéines kinases C (PKC)

Les PKC doivent passer à travers plusieurs phosphorylations afin de devenir catalytiquement actives. Les vingt dernières années d'étude des PKC ont été consacrées majoritairement à la forme active des PKC, c'est à dire la forme phosphorylée, celle qui est capable de transmettre des signaux. La forme non phosphorylée quand à elle, s'accumule dans le cytosol et est incompétente sur le plan signalétique (Newton, 2001). Ce n'est qu'en 1998 que la protéine kinase en amont des PKC a été découverte. Il s'agit de la kinase phosphoinositide-dépendante (PDK-1) (Chou et al., 1998). PDK-1 a initialement été découverte comme étant la protéine kinase en amont d'Akt/protéine kinase B (PKB) (Alessi et al., 1997). C'est la similarité dans leur séquence de boucles d'activations qui ont poussé les scientifiques à vérifier s'ils possédaient la même protéine activatrice (Figure 14). Ce fut le cas pour les PKC conventionnelles et atypiques (Chou et al., 1998; Dutil, Toker, & Newton, 1998). La Figure 14 illustre les trois points de phosphorylation conservés chez les PKC. Il s'agit de la boucle d'activation située à proximité du commencement du site catalytique, du motif de tour (turn motif) situé à l'apex d'un tour et finalement du motif hydrophobique qui est bordé par des résidus hydrophobiques. En plus des phosphorylations à ces trois sites, la phosphorylation des résidus Ser/Thr et Tyr est nécessaire à la fonction des PKC matures (Newton, 2001).

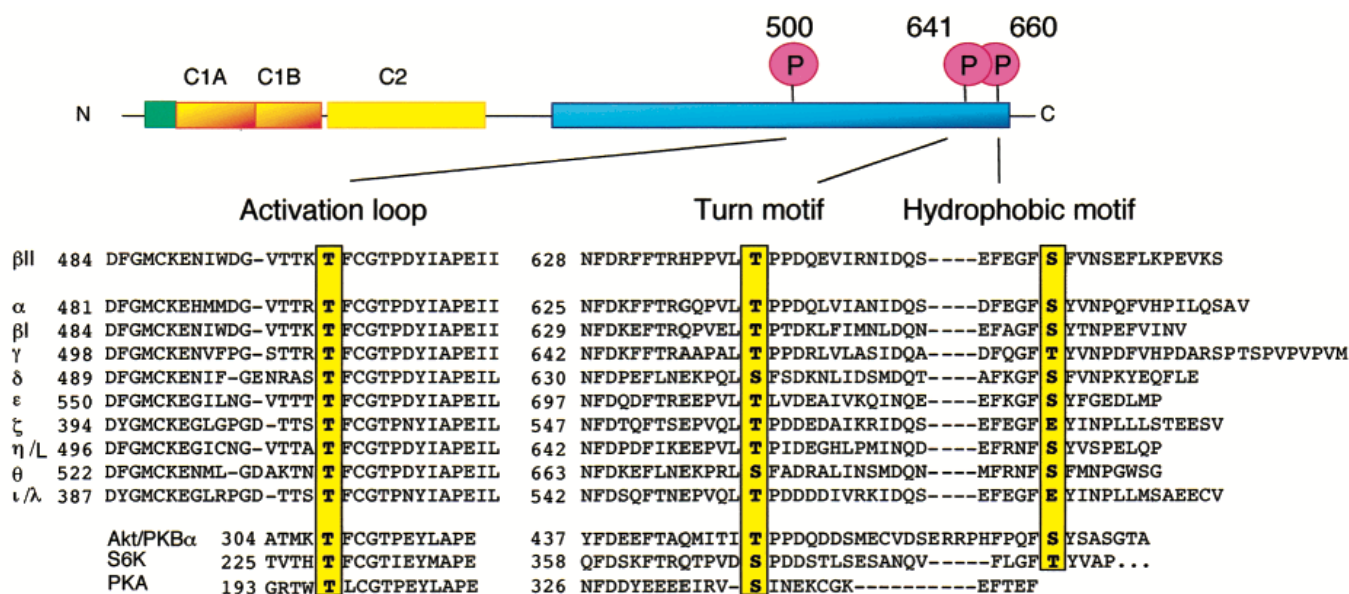


Figure 14 : Sites de phosphorylation des PKC

Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 101(8), 2353-2364.

### **PDK-1 et la phosphorylation de la boucle d'activation**

La première étape menant à une PKC active et compétente est la phosphorylation de la boucle d'activation des PKC par PDK-1. Ceci constitue l'étape limitante dans l'activation des PKC. Le phosphate situé à la boucle d'activation a deux rôles. Il positionne les résidus pour la catalyse et il libère l'entrée où le substrat va venir se lier à la PKC (Johnson & O'Reilly, 1996). Bien que la phosphorylation de la boucle d'activation soit obligatoire à l'obtention d'une PKC mature et fonctionnelle, elle n'est plus requise une fois que la portion terminale de la PKC a été phosphorylée. Des analyses de spectrométrie de masse des PKC chez les bovins ont démontré que seule la moitié des PKC matures est phosphorylée sur la boucle d'activation. (Keranen, Dutil, & Newton, 1995)

### **Phosphorylation du motif de tour**

La phosphorylation de la boucle d'activation mène à la phosphorylation rapide d'un motif situé dans une zone des PKC riche en proline, le motif de tour. La phosphorylation de ce site semble être assurée par un processus d'autophosphorylation. Une fois la PKC mature, le phosphate au motif de tour suffit et est le seul élément nécessaire à l'activation de la PKC, la déphosphorylation de ce site menant à l'inactivation de la PKC (Keranen et al., 1995). Des études biochimiques ont démontré que la phosphorylation de ce site garde la PKC dans une position catalytiquement compétente, stable thermiquement et où elle n'est pas sensible à l'action des phosphatases (Bornancin & Parker, 1996; Edwards, Faux, Scott, & Newton, 1999). En plus de son rôle dans la maturation et dans l'activité des PKC, la phosphorylation du motif de tour pourrait assurer un rôle dans les interactions protéines-protéines (Newton, 2001).

### **La phosphorylation du motif hydrophobique**

À la suite de la phosphorylation du motif de tour, l'autophosphorylation du motif hydrophobique se déroule rapidement. L'ajout d'un phosphate à ce site n'est pas nécessaire à l'activité des PKC, mais celui-ci influence la position intracellulaire ainsi que la stabilité de ces dernières (Newton, 2001).

### **Phosphatidylsérine**

La phosphatidylsérine est un lipide qui participe à la régulation de tous les isoformes de PKC. Ce lipide est exclusivement retrouvé dans la partie cytoplasmique des membranes et il représente généralement 15% des lipides membranaires (Newton, 1993). Des études ont démontré qu'en absence de DAG, l'affinité des PKC pour les membranes contenant de la phosphatidylsérine est très faible comparativement à l'affinité envers d'autres membranes possédant des lipides anioniques monovalents. Toutefois, en présence de DAG, l'affinité des PKC pour les membranes phosphatidylsérine <sup>(+)</sup> augmente significativement. La liaison des PKC avec la PS se fait via leur domaine régulateur, plus précisément via le domaine de liaison C1. Toutefois la région exacte de ce domaine n'est pas connue. Bien que le site de liaison exacte ne soit pas connu, il est logique que la PS se lie via la région C1, étant donné que la PS active tous les isoformes de PKC et le C1 est le domaine commun à tous les isoformes de PKC (Newton, 2001).

### **Le diacylglycérol et les phorbols esters**

Le diacylglycérol (DAG) et les phorbols esters régulent les PKC de la même façon, en participant au recrutement et à l'adhésion des PKC aux membranes PS <sup>(+)</sup>. Bien qu'ils agissent via le même mécanisme, ils peuvent avoir des effets biologiques différents pour deux raisons. En premier lieu, le recrutement des PKC à la membrane via le DAG est passager, l'effet de ce dernier est bref étant donné que celui-ci est métabolisé rapidement. Les phorbols esters quant à eux ne sont pas métabolisés facilement, de sorte qu'il résulte une activation constitutive des PKC. En second lieu, sur le plan molaire, les phorbols esters sont deux fois plus puissants que le DAG dans le recrutement des PKC aux membranes. L'effet des phorbols esters est si puissant qu'il permet le recrutement de PKC à des membranes dépourvues de tout lipides anioniques (Newton, 2001).

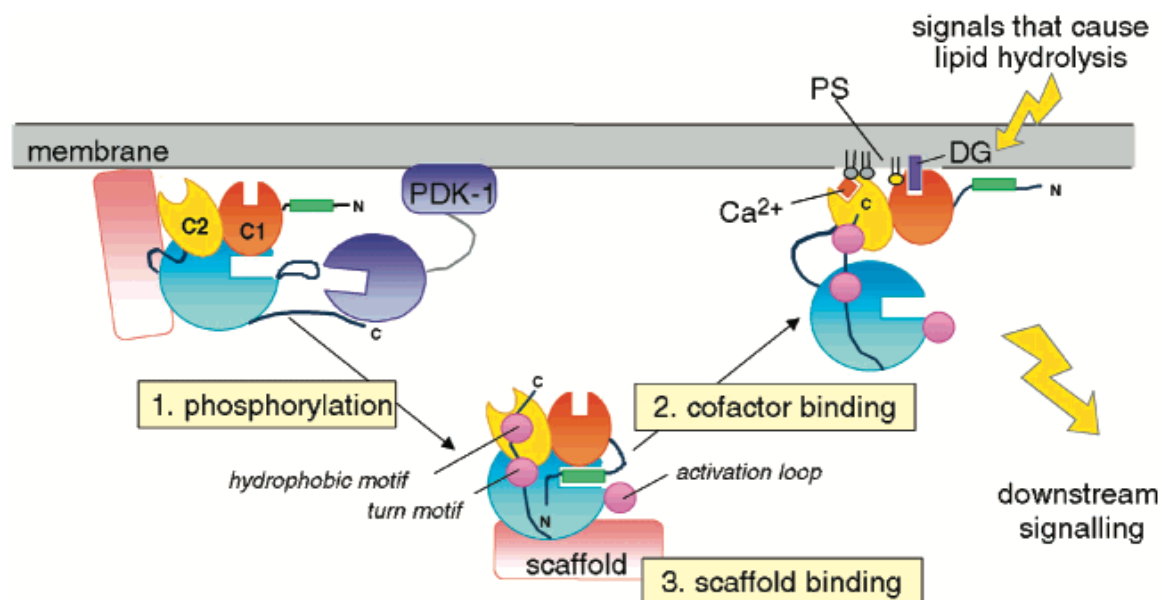
### **Calcium**

La sensibilité des PKC conventionnels pour le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est ce qui les distingue des autres PKC, ces dernières ne pouvant pas être régulées par le calcium. Le calcium participe à la translocation à la membrane des PKC conventionnelles en augmentant l'affinité de leur domaine C2 pour les anions lipidiques. Il est toutefois important de noter que le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est ni essentiel à la translocation à la membrane des PKC conventionnelles, ni à leur activation. Lorsque le domaine de liaison C1 des PKC conventionnelles est suffisamment ancré à la membrane cellulaire,

l'ancrage du domaine C2 n'a pas besoin d'être complet pour qu'il y ait activation de la PKC. De plus, le calcium agit en synergie avec le diacylglycérol pour activer les PKC conventionnelles, chacun des deux ligands agissant indépendamment pour augmenter l'affinité aux lipides anioniques (Newton, 2001).

### Les protéines d'ancrage et d'échafaudage

Les fonctions biologiques des PKC dépendent de leur position spatiale. Celle-ci est influencée par diverses protéines qui servent d'ancrage ou d'échafaudage aux PKC. Ces dernières s'assurent de positionner les PKC à proximité des substrats, de leurs régulateurs ou encore dans des compartiments intracellulaires. Certaines favorisent la signalisation cellulaire, alors que d'autres, dépendamment du type de protéines d'ancrage ou d'échafaudage, vont l'inhiber en se liant aux PKC via leur domaine régulateur ou via leur domaine catalytique (Figure 15) (Newton, 2001).



**Figure 15 : Régulation des PKC**

Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 101(8), 2353-2364.

## **Souris transgénique**

Un des nombreux problèmes rencontrés dans le monde de la recherche est la difficulté de reproduire les résultats *in vitro* dans des modèles animaux. Un des moyens élaborés par les scientifiques a été de créer des souris génétiquement modifiées. Celles-ci rendent possible l'étude des désordres génétiques, de la fonction normale des gènes ainsi que l'effet des drogues et des toxines. Les modèles *in vivo* possèdent plusieurs avantages par rapport aux modèles *in vitro*. Ils permettent d'évaluer plusieurs facteurs difficiles, voir même impossible à évaluer sur des cellules en culture. Parmi ces facteurs, on compte l'âge, le stress, l'interaction hôte-pathogène, la réponse immunitaire, la fonction cervicale et bien d'autres. Bien que ces souris soient d'une aide précieuse en recherche, les résultats obtenus chez ces modèles transgéniques ne sont pas nécessairement transposables chez l'humain. De plus, les modèles transgéniques peuvent présenter certaines failles, certaines modifications géniques entraînant un développement inapproprié ou de la mortalité embryonnaire. Afin de résoudre ces problèmes, des systèmes ont été créés permettant de contrôler l'expression des transgènes. Gordon et ses collègues furent les pionniers d'injection d'ADN recombinant dans les oocytes de souris et leurs travaux ont permis de créer des milliers de modèles murins pour la recherche. (Gordon, Scangos, Plotkin, Barbosa, & Ruddle, 1980) De nos jours, deux techniques sortent du lot pour générer des souris modifiées génétiquement ; il s'agit de la micro-injection d'ADN recombinant dans les oocytes de souris et des techniques conventionnelles de ciblage génique, KO et KI (knock out et knock in) (Bockamp et al., 2008).

### **Micro-injection d'ADN recombinant dans les oocytes de souris**

La micro-injection d'ADN recombinant dans les oocytes de souris est une technique développée dans les années 1980 et permet de créer des souris transgéniques (Babinet, 2000; Nagy, 2003; Rulicke, 2004). Toutefois, l'ADN inséré dans le génome murin y est introduit de façon aléatoire en une copie, ou en copie multiple. En général, la construction à insérer est formée d'une séquence d'ADN liée à un promoteur, ou encore une séquence d'ADN liée à un promoteur lui-même lié à un amplificateur. La séquence de la construction permet de contrôler le modèle d'expression de même que le niveau d'expression de la séquence d'ADN dans un tissu spécifique ou même à un certain stade développemental.

Un des problèmes avec cette technique est que le lieu d'insertion de la construction est aléatoire et peut donc s'insérer à un endroit où les gènes environnants influenceront l'expression du transgène. Une des possibilités est que le transgène s'insère dans une structure chromatinienne sujette à être inactivée durant le développement. Ceci se traduirait par une non expression du transgène. De plus, l'intégration du transgène peut résulter en la destruction du locus de gènes où il s'est inséré, ou encore, le transgène peut affecter l'expression des gènes avoisinants. C'est pour cette raison qu'il est important via cette technique de féconder un grand nombre d'ovocytes afin d'obtenir la mutation souhaitée (Bockamp et al., 2008). Ces problèmes avec l'insertion du transgène sont rassemblés sous le terme d'effet du positionnement ('position effect'), ceux-ci peuvent compliquer l'analyse et l'interprétation des études sur les souris transgéniques (Babinet, 2000).

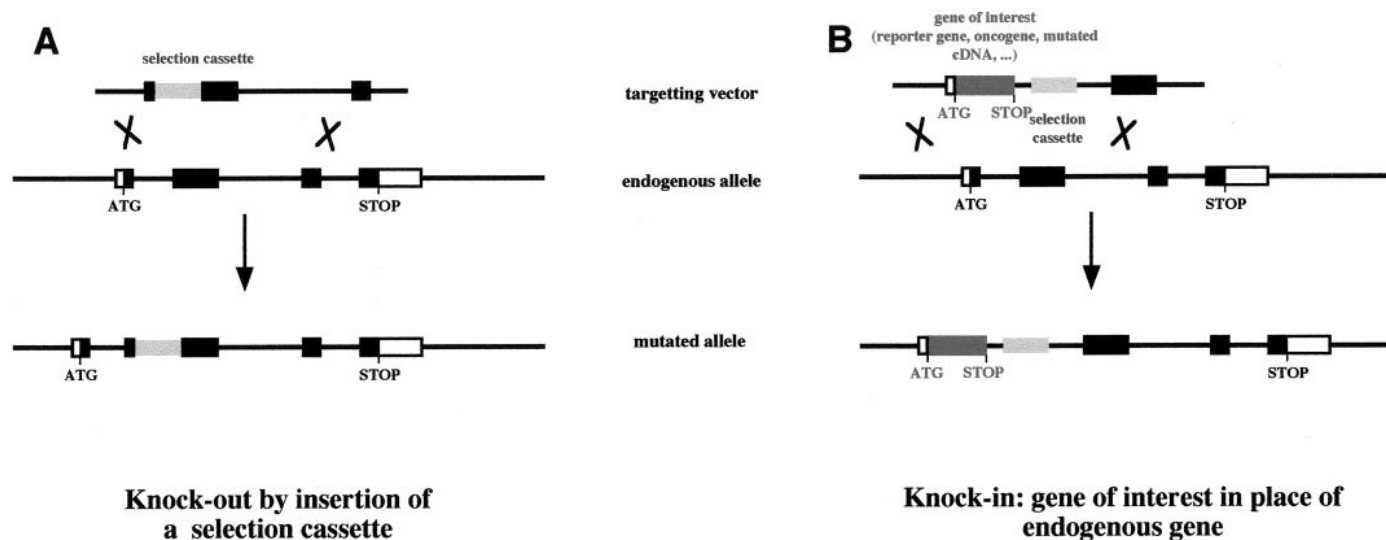
### **Technique conventionnelle de ciblage génique**

La 2<sup>e</sup> technique de création de souris transgénique nécessite l'utilisation de ESCs (cellules souches embryonnaires) de souris pluripotentes. Cette technique est basée sur la découverte selon laquelle les cellules des mammifères possèdent la machinerie nécessaire à la recombinaison homologue entre séquences d'ADN identiques (Evans & Kaufman, 1981) (Smithies, Gregg, Boggs, Koralewski, & Kucherlapati, 1985). En utilisant cette capacité de recombinaison homologue, les scientifiques ont été capables de modifier génétiquement des cellules en culture tel que des ESCs. Ces ESCs sont par la suite utilisées afin de générer des souris KO (knockout) ou KI (knockin) (Smithies et al., 1985). En général, ces ESCs pluripotentes modifiées génétiquement sont insérées dans les blastocytes de souris et vont participer à la formation des tissus et des cellules germinales. Les souris ainsi créées auront le génome sauvage ainsi que le génome modifié. L'accouplement de souris dont les ESCs ont participé à la formation des cellules germinales permettra de produire les souris transgéniques portant la mutation désirée (Bockamp et al., 2008).

**Souris KO**

La génération de souris KO nécessite le remplacement d'un allèle endogène par un allèle nul via recombinaison homologue, l'allèle fonctionnel étant remplacé par un allèle donnant un produit génique non fonctionnel (Bronson & Smithies, 1994; Capecchi, 1989). L'obtention de ce résultat est réalisée grâce à l'utilisation d'un vecteur contenant des séquences du gène d'intérêt ainsi qu'une cassette de sélection insérée dans un exon (Babinet, 2000). Les séquences du gène d'intérêt sont généralement aux extrémités de la construction et vont s'aligner avec les séquences génomiques homologues. À travers cette recombinaison homologue, le centre de la construction va s'intégrer au génome et ainsi produire l'allèle nul. La cassette de sélection confère aux cellules qui l'intègrent, une résistance à des conditions particulières de culture cellulaire. Il est donc possible d'identifier les cellules ayant incorporées le vecteur via reproduction de ces conditions particulières, seules les cellules ayant intégrées la cassette survivront (Bockamp et al., 2008).

Après l'insertion du vecteur dans les ESCs, les clones résistants aux conditions particulières de culture sont sondés afin de vérifier l'intégration adéquate du vecteur (Babinet, 2000). Bien qu'il y ait une certaine spécificité attribuable à la recombinaison homologue, la plupart du temps, le vecteur va s'intégrer de façon aléatoire. Des stratégies de vérification de la recombinaison ont donc été développées. Les cassettes de sélection négatives sont insérées dans le vecteur à l'extérieur des séquences homologues et sont perdues lorsque la recombinaison homologue est adéquate. Toutefois, lorsque l'insertion du vecteur est aléatoire, les cassettes de sélection négative sont conservées et les ESCs présentant ces cassettes sont donc mises de côté (Bockamp et al., 2008).



**Figure 16 : Souris KO et KI**

Babinet, C. (2000). Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *J Am Soc Nephrol*, 11 Suppl 16, S88-94.

### Souris KI

La technique utilisée pour générer des souris KI est une extension de celle utilisée pour faire des souris KO, la différence majeure étant l'ajout d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) dans le vecteur créé en laboratoire (Figure 16). L'ADNc complémentaire est donc insérée dans le génome et est exprimée à la place du gène endogène. Un des avantages de cette technique est que l'expression de l'ADNc insérée est contrôlée par les éléments régulateurs du gène endogène (Babinet, 2000).



## Objectifs de l'étude

L'avènement des percées technologiques dans notre société a ouvert la porte à un mode de vie plus aisé et moins demandant sur le plan physique. Conséquemment, une augmentation des maladies découlant d'un mode de vie sédentaire a été observée. L'infarctus du myocarde fait partie de ce fléau. Il en découle une atteinte à la fonction cardiaque dû à la mort des cellules contractiles du cœur, les cardiomyocytes. Cette mort cellulaire est accompagnée de la formation d'une cicatrice formée essentiellement de collagène sécrété en grande partie par les fibroblastes cardiaques. Autrefois, les cardiomyocytes étaient considérés comme étant une population cellulaire incapable de prolifération une fois l'âge adulte atteint. Toutefois, des études récentes ont démontré que le cœur avait une faible capacité régénérative, particulièrement sous certaines conditions pathologiques tel qu'un infarctus du myocarde (Beltrami et al., 2001; Engel et al., 2006). Par contre, aucun marqueur ne permettait d'identifier les cardiomyocytes s'appêtant à entrer dans le cycle cellulaire.

Le modèle *in vivo* de souris transgénique a révélé que l'apparition des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur infarci n'était pas attribuable aux cellules souches/progénitrices neurales résidentes cardiaques. En se basant sur ces données, nous avons testé l'hypothèse alternative que nestine peut être ré-exprimée dans les cardiomyocytes ventriculaires et représente possiblement un marqueur de réentrée dans le cycle cellulaire. Afin d'examiner cette hypothèse, nous avons eu recours à des cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux car des études antérieures ont démontré qu'une sous-population de ces cellules a la capacité de réentrer dans le cycle cellulaire en réponse à une stimulation adéquate (Lu, Sontag, Detillieux, & Cattini, 2008).

Suite à un infarctus du myocarde, il y a prolifération des cardiomyocytes exprimant la nestine qui est un marqueur de réentrée dans le cycle cellulaire. Nos objectifs sont dans un premier temps de déterminer si l'augmentation de nestine observée dans les cardiomyocytes à la suite d'un infarctus du myocarde était attribuable à une prolifération de ces derniers, et dans un deuxième temps, de déterminer l'origine des cellules exprimant nestine et les voies de signalisation contrôlant sa production.

## **Matériels et Méthodes :**

### **Culture cellulaire de myocytes et de fibroblastes ventriculaires de rats néonataux :**

Les cœurs des rats néonataux âgés de 1 à 3 jours sont isolés stérilement, puis lavés dans des bains successifs de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Les ventricules sont découpés en petits morceaux afin de faciliter la digestion, puis placés dans une solution de trypsine 0,25% pendant 20 heures sous agitation constante. Afin d'arrêter l'effet de la trypsine, 10mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté de Fœtal Bovine Serum (FBS) 7% et de Peniciline/Streptomycine est ajouté aux cœurs. Les tissus subissent ensuite des digestions successives via la collagénase. À la suite de leur digestion, les culots cellulaires sont récupérés par centrifugation à 1500 RPM à 4°C, puis ces derniers sont lavés dans du HBSS et finalement re-suspendus dans du FBS. La solution cellulaire contient à ce moment des fibroblastes et des myocytes ventriculaires, toutefois, ces 2 types cellulaires n'ont pas la même vitesse d'adhésion. Cette différence dans leur vitesse d'adhésion est utilisée afin de les séparer. On place notre solution cellulaire 45 min dans des flasques de 75mm<sup>2</sup> (T75). À la fin de ce temps d'attente, les cardiomyocytes seront en suspension alors que les fibroblastes auront pour la plupart adhéré aux T75. On récolte les cellules en suspension et on répète ce processus afin d'obtenir la population la plus pure de cardiomyocytes. Il est toutefois important de noter que la présence de fibroblastes est inévitable, il faut donc en tenir compte dans les analyses. On procède par la suite au décompte des cellules en suspension et on les distribue selon nos besoins dans différentes plaques. Tel que confirmé par immunofluorescence/microscopie confocale avec le marquage troponine T cardiaque, la majorité de ces cellules sont des myocytes ventriculaires de rats néonataux. Les fibroblastes sont laissés dans les T75 dans du DMEM supplémenté de FBS jusqu'à l'atteinte de la confluence. Une fois la confluence atteinte, on passage les fibroblastes, ceci nous permet d'obtenir davantage de fibroblastes. Étant donné la fragilité *in vitro* des myocytes ventriculaires, ces derniers ne sont pas passagés. Des études antérieures ont démontré que des facteurs de croissance via des voies PKC-dépendantes stimulaient la prolifération des myocytes ventriculaires de rats néonataux (Lu et al., 2008). Basé sur ces études, nous avons stimulé les cellules ventriculaires cardiaques de rats néonataux avec le PDBu, un activateur des PKC

couramment utilisé. En parallèle et dans le but de servir de contrôle positif, les cellules ventriculaires cardiaques de rats néonataux ont été stimulées avec le FBS 10%, un activateur connu de la prolifération cellulaire. Des études antérieures ont démontré que les voies p38 inhibaient la prolifération des myocytes ventriculaires induite par des facteurs de croissance (Engel et al., 2006). Basé sur ces études, nous avons regardé si la modeste capacité de PDBu à augmenter nestine dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux était attribuable à la phosphorylation de la p38 MAPK.

### **Passage des fibroblastes cardiaques de rats néonataux**

Une solution de Trypsine-EDTA est utilisée afin de faire décoller les cellules, cette solution permet de couper les liens cellules-cellules et les liens cellules-T75. Afin que celle-ci soit efficace, il est important de rincer une première fois les cellules avec du PBS (phosphate buffered saline) 1X ou avec de la trypsine EDTA. Les cellules sont recueillies dans un bécher stérile et homogénéisées afin de procéder à leur décompte. Celles-ci sont par la suite mises en culture selon les besoins de l'expérience.

### **Immunofluorescence et microscopie confocale**

Les cellules sur lamelles sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 2%, puis elles sont entreposées à -20°C en immersion dans une solution de PBS 1X/glycérol. Lors de l'expérience, ces dernières sont retirées du congélateur puis soumises à des lavages successifs en douceur de PBS 1X afin de retirer toute trace de glycérol. Il est important d'y aller en douceur afin de conserver l'intégrité des cellules. Dans le but d'assurer un marquage spécifique des différentes protéines, les lamelles ont été immergées dans une solution de blocage (PBS 1X ; normal goat serum (NGS) 2% ; triton 0,2%). Une fois le blocage fini, les lamelles sont mises en contact avec l'anticorps primaire jusqu'au lendemain. Le lendemain matin, les anticorps primaires sont hybridés avec des anticorps secondaires qui nous permettent de détecter le signal des différents anticorps primaires. La microscopie confocale a été réalisée à l'aide d'un microscope LSM 510 Zeiss, et du programme Zen 2008.

### **Incorporation de la Thymidine-H3**

L'incorporation de la thymidine-H3 est une technique qui permet d'évaluer la synthèse d'ADN. Les cellules sont stimulées 24h avec différents agents (SB 203580 10uM, PDBu  $10^{-7}$ M, SB 203580 10uM + PDBu  $10^{-7}$ M) et à la 18<sup>e</sup> heure de stimulation on ajoute la thymidine-H3 (1

uCi/mL). À la 24<sup>e</sup> heure de stimulation, les cellules sont rincées avec du PBS 1X froid et laissées pour une durée minimale de 1 heure à 4°C dans de l'acide trichloracétique (TCA) 10%. Le TCA permet de fixer l'ADN cellulaire dans le fond des plaques. Une fois le temps d'attente terminé, les plaques sont rincées à l'eau froide et mises dans du NaOH 0,4M à la température de la pièce pour une durée minimale de 30 min. Cette étape permet de resuspendre l'ADN précipité par le TCA. L'ADN ainsi resuspendu est transféré dans des fioles à scintillation auxquels on ajoute 5mL de liquide de scintillation. La radioactivité est détectée grâce à un compteur de scintillation BECKMAN, et les résultats obtenus sont en CPM. Toutefois, les résultats de croissance présentés dans ce mémoire sont en pourcentage de variation par rapport à un contrôle.

### **Électrophorèse et immunobuvardage de type western :**

À la suite des différents traitements (SB 203580 10uM, PDBu  $10^{-7}$ M, SB 203580 10uM + PDBu  $10^{-7}$ M), les cellules présentes dans les pétris sont lavées avec du PBS 1X froid et lysées avec un tampon contenant des inhibiteurs de phosphatases afin de nous permettre de voir la phosphorylation des différentes kinases présentes. Une fois dosés et aliquotés, les échantillons sont entreposés à -20 °C. La veille de l'expérience, ces derniers sont décongelés sur glace puis mélangés avec de l'acétone. Ceux-ci sont ensuite remis au congélateur jusqu'au lendemain afin de laisser précipiter les protéines. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 12000 rpm (rotation par minute). Le culot protéique ainsi obtenu est re-suspendu dans 15 uL de tampon d'électrophorèse. Les protéines sont ensuite chauffées puis séparées selon leur taille par électrophorèse dans un gel de SDS-polyacrylamide (15%). Le transfert des protéines sur une membrane de PVDP est d'1h 45min. Afin de bloquer les sites non spécifiques auxquels les anticorps pourraient se fixer sur la membrane, cette dernière est immergée pendant une heure dans une solution de PBS-Tween 1X/lait 5%. La membrane est ensuite incubée jusqu'au lendemain avec l'anticorps primaire dans du PBS-Tween 1X/lait 5%. Le lendemain matin, la membrane subit des lavages de PBS-Tween 1X et est incubée pendant 1h avec un anticorps secondaire dans du PBS-Tween 1X/lait 5%. Les protéines sont finalement détectées en chambre noire par autoradiographie grâce à un ensemble de détection ECL. Dans le cas des anticorps primaires dirigés contre des protéines phosphorylées, le PBS-Tween 1X/lait 5% est remplacé par PBS-Tween 1X/albumine sérique de boeuf 5%.

## Souris transgénique nestine/GFP

Les souris transgéniques surexprimant nestine/GFP ont été obtenues par l'intermédiaire du Dr Jasmin. Le Dr Enikolopov a initialement créé ces souris en insérant dans le vecteur pBSM13<sup>+</sup> le EGFP (enhanced green fluorescent protein), une version améliorée de GFP, la séquence de polyadénylation du virus simian 40 ainsi que le fragment de 1,8kb contenant le second intron de nestine (Figure 17). (Mignone, Kukekov, Chiang, Steindler, & Enikolopov, 2004)



**Figure 17 : Plasme nestine/GFP**

Mignone, J. L., Kukekov, V., Chiang, A. S., Steindler, D., & Enikolopov, G. (2004). Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol*, 469(3), 311-324. doi: 10.1002/cne.10964

Le plasmide nestine/GFP a été isolé et purifié par centrifugation dans une solution de chlorure de césium et digéré par l'enzyme de restriction SmaI. Ce processus a enlevé le support ('backbone') du vecteur, laissant ainsi la séquence nestine/GFP intacte. Le fragment de 8,7kb ainsi isolé a été purifié par électrophorèse dans un gel d'agarose puis a été injecté dans les oocytes fertilisés de souris hybrides C57BL6 X Balb/cby. Quatre-vingt-six souris sont nées après l'injection du fragment, toutefois seulement 8 souris possédaient la séquence du second intron de nestine (5'GGAGCTGCACACAACCCATTGCC3') ainsi que celle du cDNA EGFP (5'GATCACTCTCGGCATGGACGAGC3') tel qu'analysé par réaction en chaine de polymérase. Parmi ces huit souris possédant le fragment de 510pb, trois d'entre elles étaient des mâles, ce fut leur progéniture qui fut utilisée pour produire cette lignée de souris transgénique. (Mignone et al., 2004)

## **Statistiques**

Les données sont présentées comme étant la moyenne  $\pm$  le S.E.M. (standard error to mean) et le n représente le nombre de fois qu'une expérience a été effectuée. Afin de déterminer la valeur statistique de nos résultats, ceux-ci ont été évalués par le test one-way d'ANOVA et par le test de Student-Newman-Keuls.

## **Modèle d'infarctus du myocarde**

Les infarctus du myocarde ont été induits chez des rats mâles adultes Sprague Dawley âgés d'environ 12 semaines et chez des souris transgéniques nestine/GFP adultes âgées d'environ 12 semaines. Ces souris, créées par le Dr. Enikolopov, ont été entreposées à l'université Thomas Jefferson. L'infarctus du myocarde chez ces animaux a été induit par ligature permanente de l'artère coronaire antérieure gauche. (El-Helou et al., 2013)

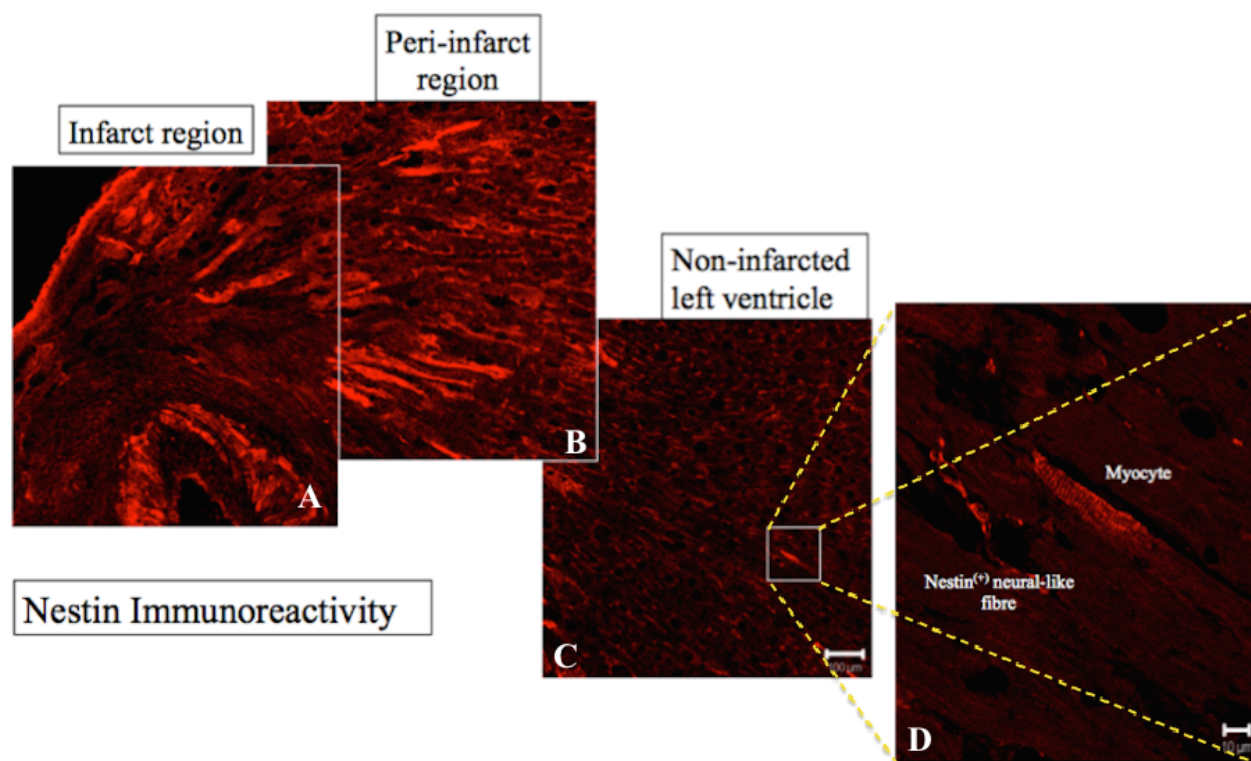
## Résultats

## Détermination du rôle de nestine dans les cardiomyocytes à la suite d'un infarctus du myocarde

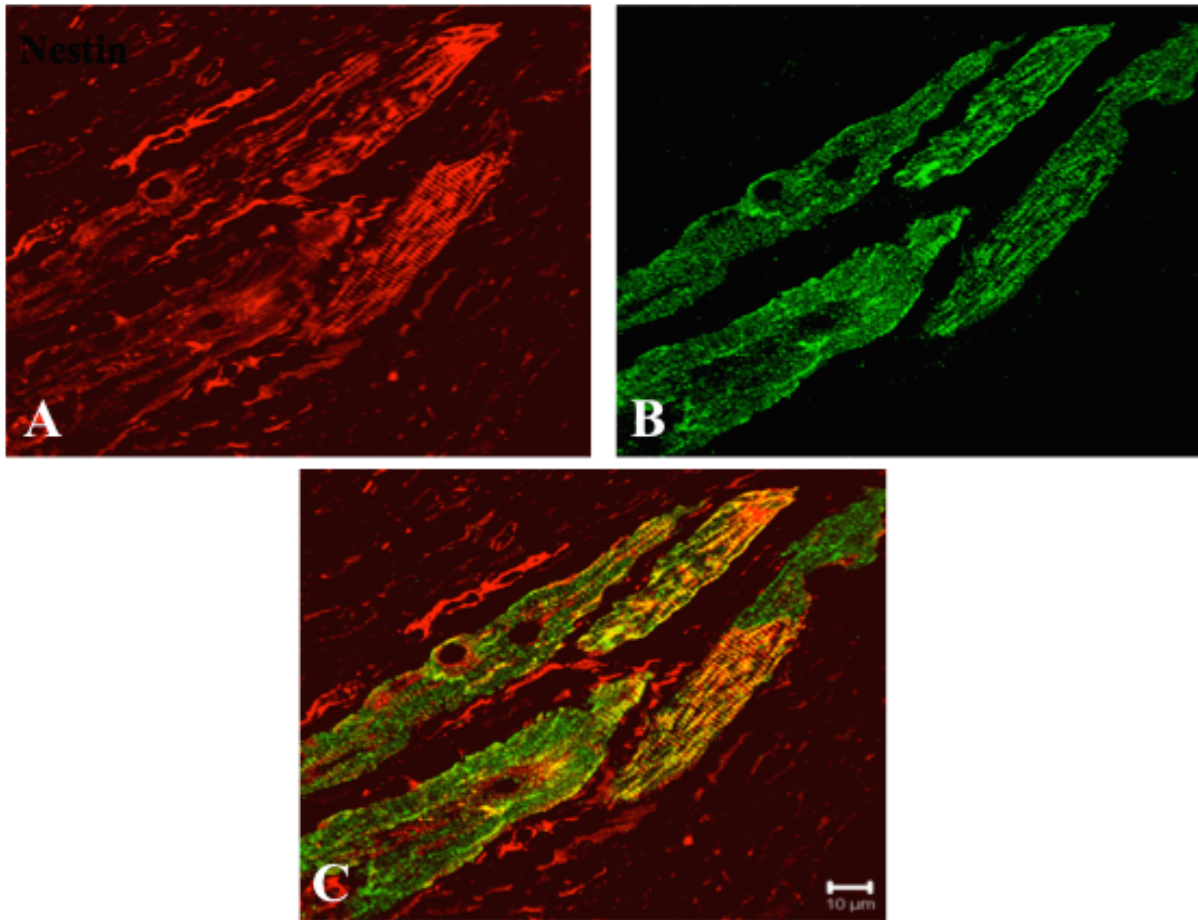
Dans le cœur de rats ayant subi un infarctus du myocarde, une sous-population de cardiomyocytes exprimant nestine a été détectée principalement à la zone infarctée/péri-infarctée. Seul un petit nombre des cardiomyocytes situés dans le ventricule gauche non infarcté exprimait nestine. (Figure 1). Dans ces cellules, le phénotype strié de nestine ainsi que le co-marquage avec desmine ont confirmé le phénotype de myocyte cardiaque. (Figure 2).

Le groupe de Tomita a suggéré qu'une population de cellules souches/progénitrices neurale située dans le cœur avait la possibilité de se différencier en cardiomyocytes (Tomita et al., 2005). Afin d'examiner ce concept, nous avons eu recours à une lignée de souris transgénique dans laquelle les cellules souches/progénitrices neurales exprimant nestine co-exprime le gène rapporteur GFP. Dans les souris transgénique nestine-GFP, des cellules nestine<sup>(+)</sup> / GFP<sup>(+)</sup> ont été détectées, intercalées entre les cardiomyocytes (Figure 3 et 4). Ces cellules nestine<sup>(+)</sup> / GFP<sup>(+)</sup> sont des cellules souches/progénitrices neurales et ont la possibilité de se différencier en cellules endothéliales dans la zone infarctée afin de former de nouveaux vaisseaux (El-Helou et al., 2013). En revanche, le marquage GFP n'a pas été retrouvé dans les cardiomyocytes ventriculaires adultes de souris. À la suite de l'infarctus du myocarde, des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> ont été détectés mais le co-marquage GFP était absent (Figure 5).

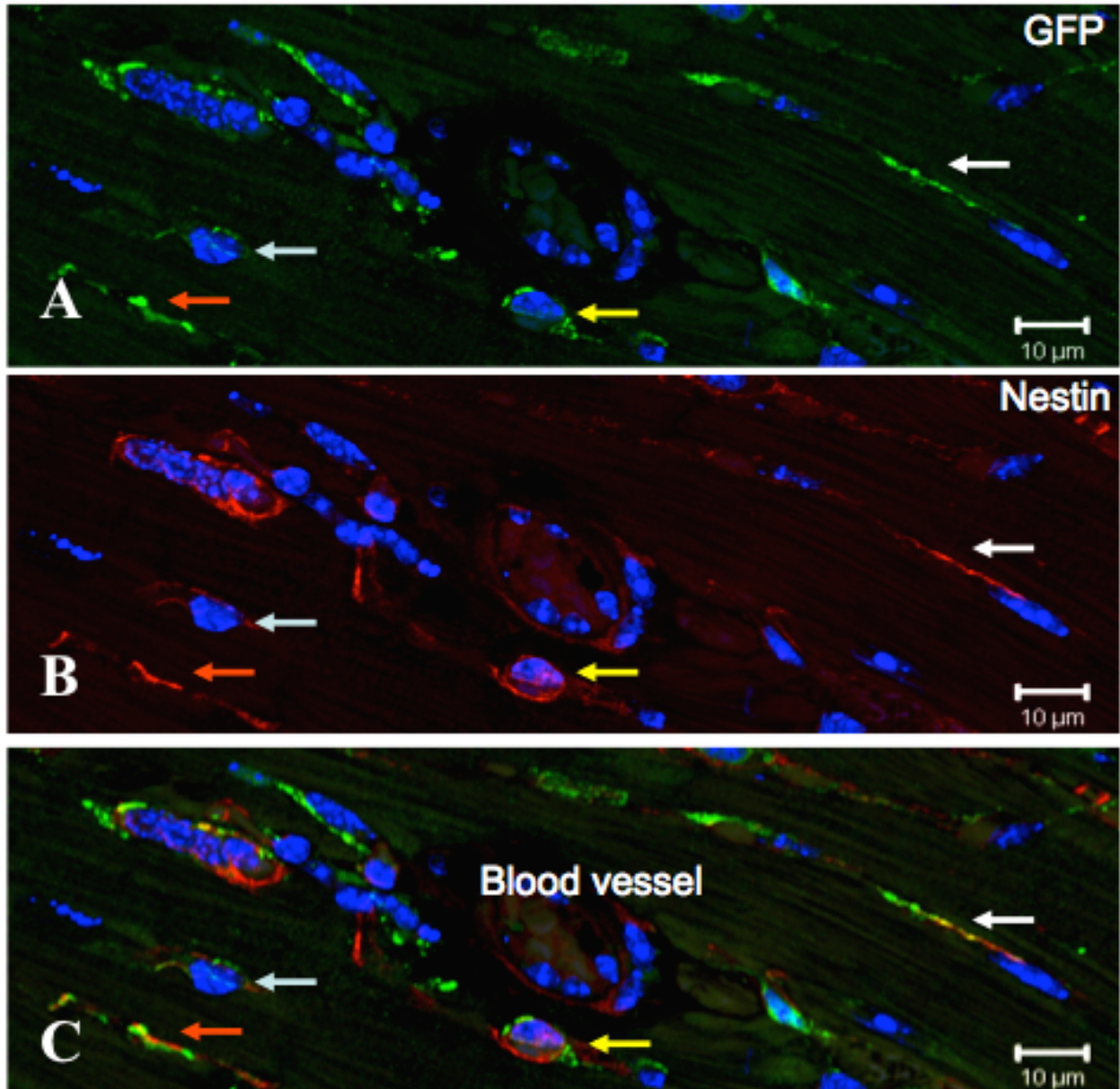




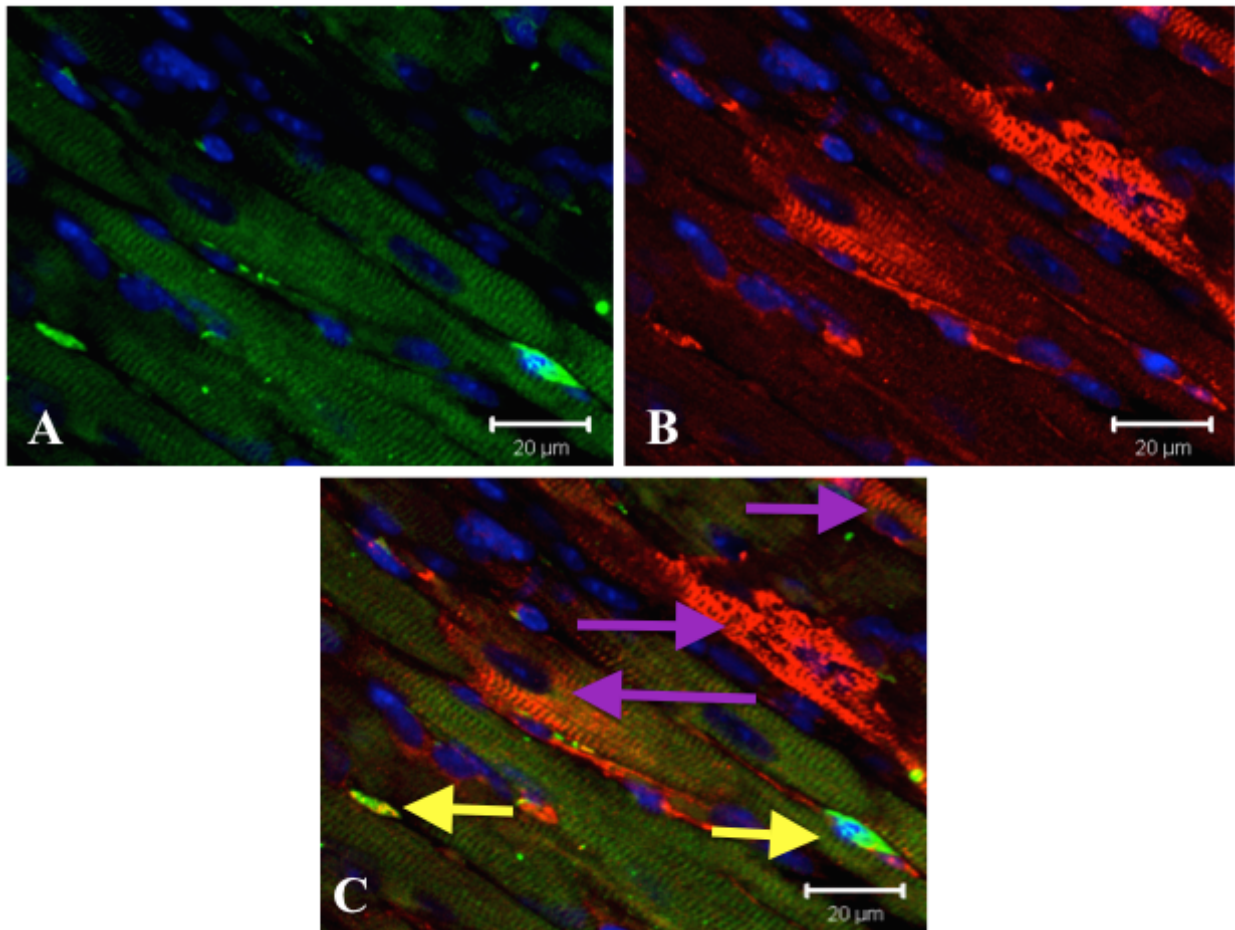
**Figure 1 : Localisation cardiaque de nestine sous sa forme protéique à la suite d'un infarctus du myocarde :** Cœur de rat MI (myocardial infarction) trois semaines post-chirurgie. Le protocole expérimental du modèle infarctus du myocarde est basé sur celui d'Andréanne Chabot à l'exception que la sélection des rats basée sur la taille de leur infarctus n'a pas été effectuée. Nous avons omis cette sélection car la taille de l'infarctus n'était pas relative à notre étude, nous voulions simplement avoir des infarctus, peu importe leur taille. (Chabot, 2011) Nestine (fluorescence rouge) est exprimée par les cardiomyocytes de la zone infarctée (Partie A), de la zone péri-infarctée (Partie B) et du ventricule gauche non infarcté (Partie C). (Partie D) Grossissement 10X de la zone non infarctée. Présence d'un cardiomyocyte nestine<sup>(+)</sup> strié, de même qu'une cellule ressemblant à une fibre neurale nestine<sup>(+)</sup>. (Parties A, B et C) Les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> sont localisés principalement à la zone infarctée et péri infarctée.



**Figure 2 : L'infarctus du myocarde mène à une augmentation des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> desmine<sup>(+)</sup> :** A et B) Présence de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> (fluorescence rouge) / desmine<sup>(+)</sup> (fluorescence verte) majoritairement à la zone infarctée/péri-infarctée chez le rat adulte. C) Superposition des signaux de nestine et desmine.

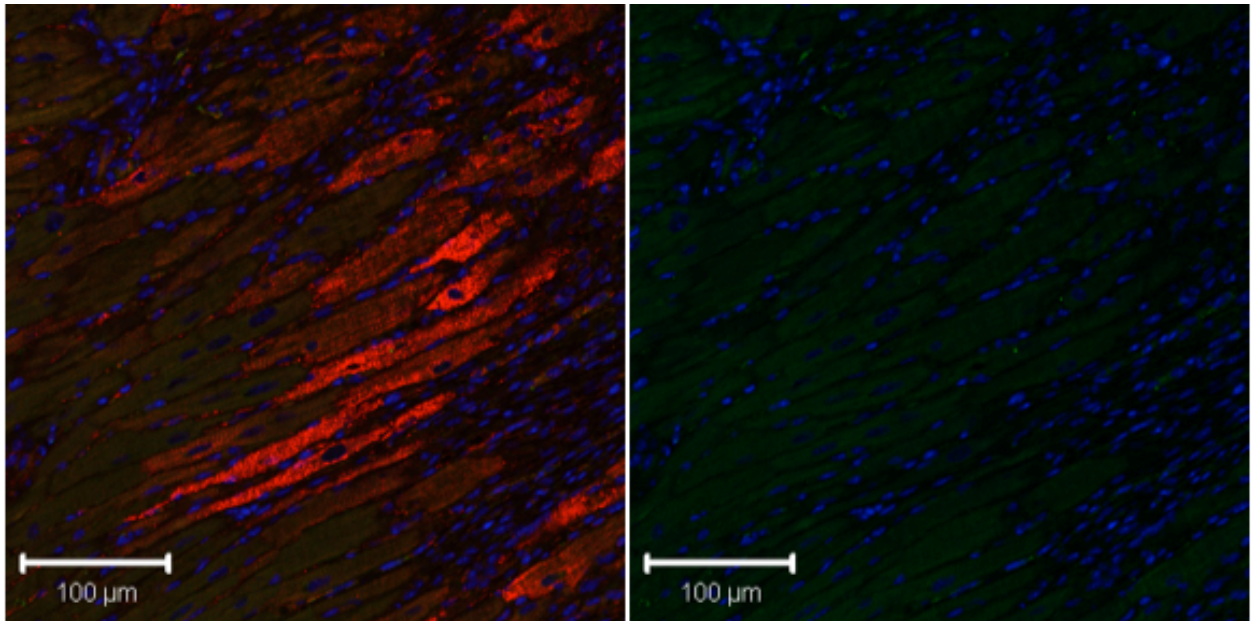


**Figure 3 : Colocalisation cellulaire du marquage nestine/GFP dans le tissu cardiaque d'une souris transgénique nestine/GFP ayant subi un infarctus du myocarde :** A et B) Présence de cellules GFP<sup>(+)</sup> (fluorescence verte) / nestine<sup>(+)</sup> (fluorescence rouge) dans le cœur d'une souris transgénique nestine/GFP MI. C) Superposition des signaux nestine et GFP. A, B, C) Les cellules coexprimant nestine et GFP sont indiquées par des flèches. Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3.



**Figure 4 : Population hétérogène de cellules cardiaque d'une souris adulte transgénique nestine/GFP ayant subi un infarctus du myocarde marqué par immunofluorescence via un anticorps dirigé contre nestine (fluorescence rouge) et contre GFP (fluorescence verte) :** A) Marquage GFP (fluorescence verte) des cellules cardiaques d'une souris transgénique nestine/GFP MI. B) Marquage nestine (fluorescence rouge) des cellules cardiaques d'une souris transgénique nestine/GFP MI. C) Superposition des signaux nestine et GFP, les cellules coexprimant nestine et GFP sont indiquées par des flèches jaunes tandis que les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> / GFP<sup>(-)</sup> sont indiqués par des flèches mauves. Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3. Le signal vert pâle dans les cellules striées représente le bruit de fond.

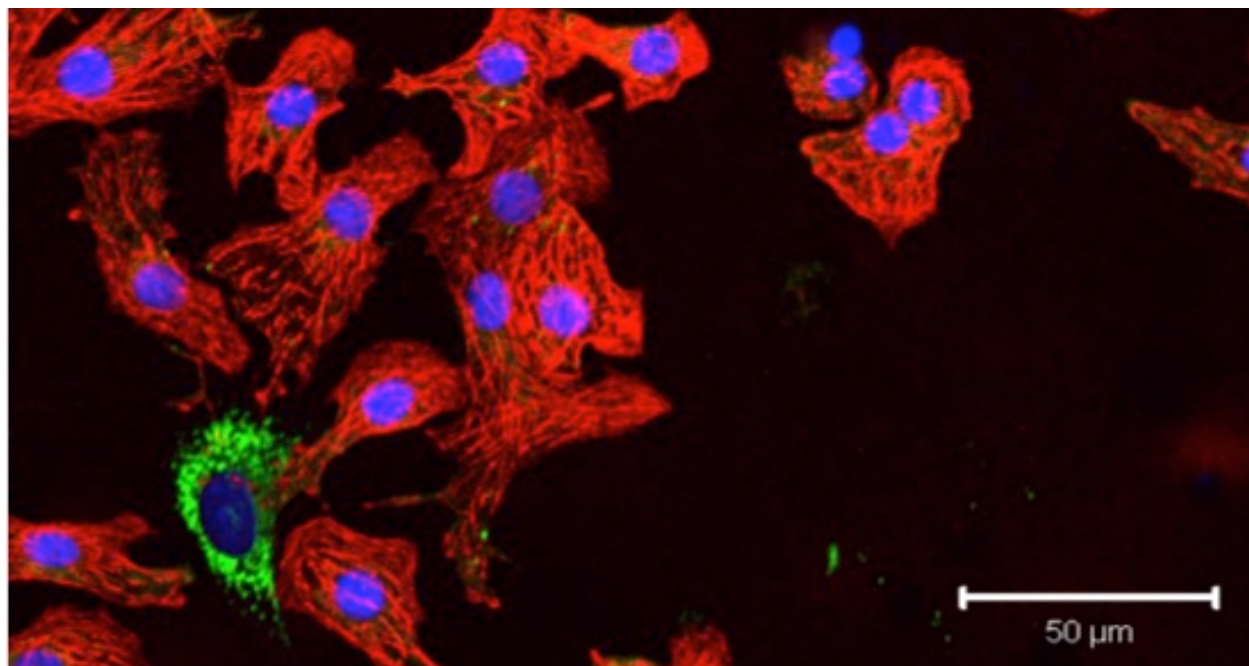




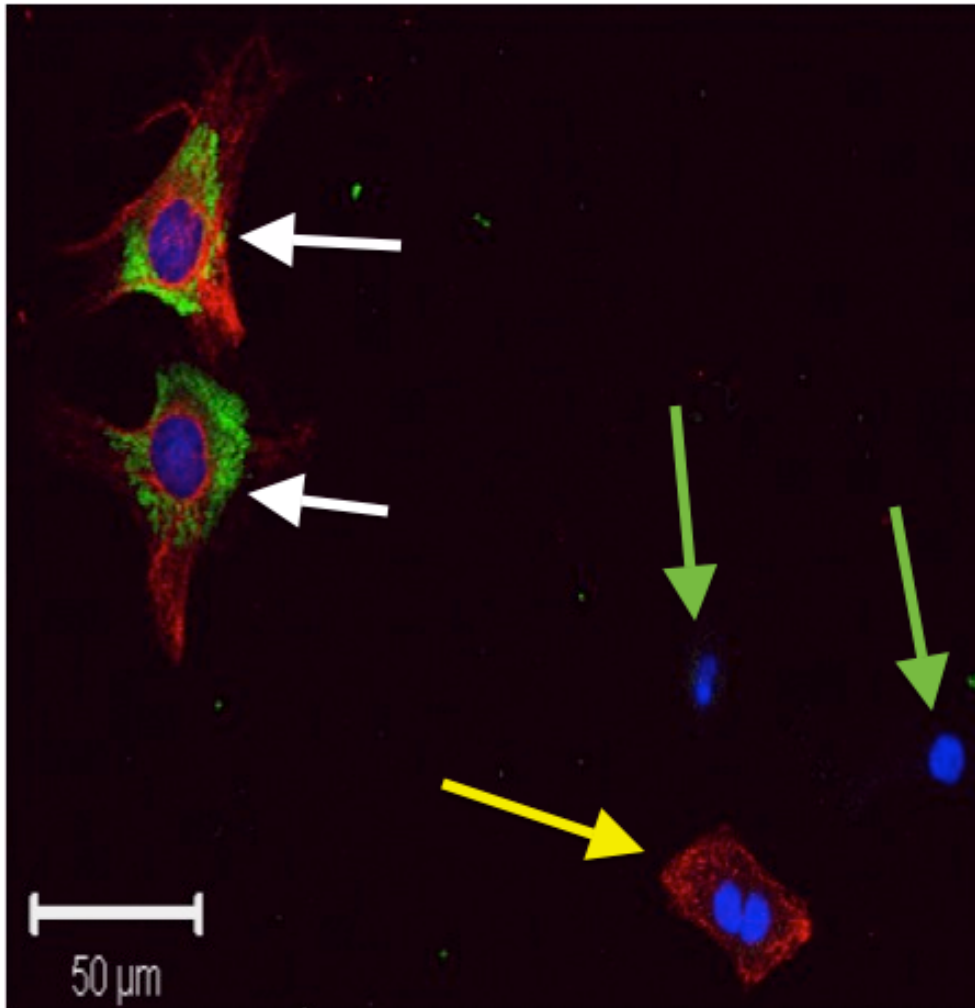
**Figure 5 : Absence de colocalisation du marquage nestine/GFP dans les cardiomyocytes d'une souris transgénique nestine/GFP MI :** (Partie gauche) Présence de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> (fluorescence rouge). (Partie droite) Absence de cardiomyocytes GFP<sup>(+)</sup> (fluorescence verte), présence du bruit de fond du signal GFP (faible fluorescence verte). (Partie gauche et droite) Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3.

## **Détermination de l'origine des cellules exprimant nestine et les voies de signalisation contrôlant sa production**

Afin de différencier les fibroblastes et les cardiomyocytes provenant de cœurs de rats néonataux dans les cultures cellulaires, les cardiomyocytes ont été détectés via un marquage spécifique à la troponine T cardiaque et les fibroblastes via un marquage au collagène  $\alpha 1$  (Figure 6). Notre étude a démontré qu'environ 75 à 80% des cellules isolées à partir des cœurs de rats néonataux sont des cardiomyocytes et le reste est constitué en grande majorité de fibroblastes. Il est important de noter que les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux expriment nestine et cette dernière contribue à leur prolifération. D'où la nécessité de toujours réaliser un co-marquage collagène  $\alpha 1$  afin de différencier les cardiomyocytes ventriculaires des fibroblastes ventriculaires (Figures 7 et 8).

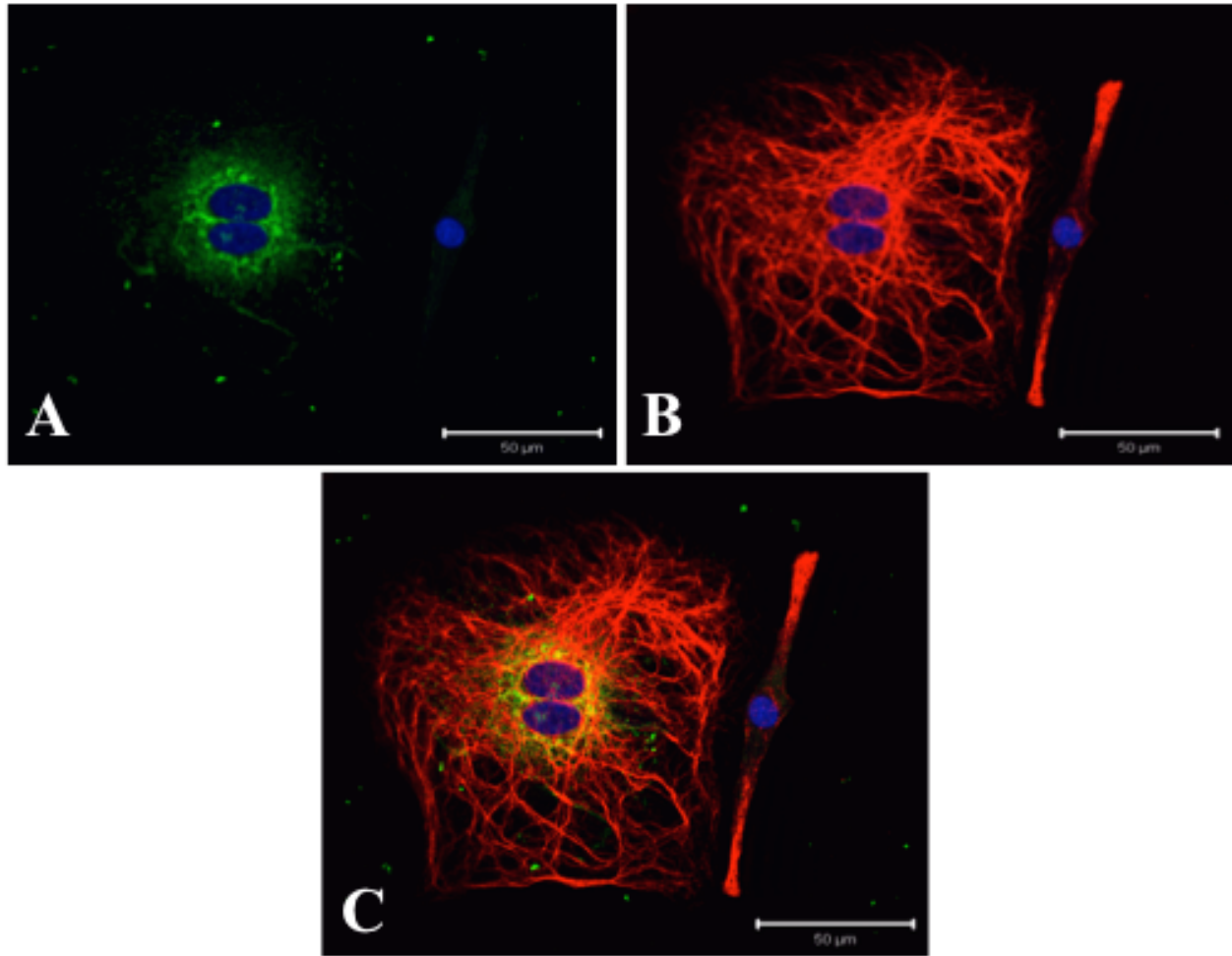


**Figure 6 : Population hétérogène de fibroblastes et de cardiomyocytes de rats néonataux marqués avec le collagène  $\alpha 1$  (fluorescence verte), troponine T cardiaque (fluorescence rouge), DAPI (fluorescence bleue) :** Les cellules ont été marquées par immunofluorescence et observées par microscopie confocale tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Images analysées avec Zeiss LSM Image Browser. Les fibroblastes sont marqués par l'anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$  et apparaissent en vert tandis que les cardiomyocytes sont marqués par l'anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque et apparaissent en rouge. Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3. On peut apercevoir une belle striation de la troponine T cardiaque dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux de même qu'un marquage collagène  $\alpha 1$  dans un fibroblaste ventriculaire de rats néonataux.



**Figure 7 : Population hétérogène de fibroblastes et de cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux marqués avec le collagène  $\alpha 1$  (fluorescence verte), nestine (fluorescence rouge), DAPI (fluorescence bleue) :** Les cellules ont été marquées par immunofluorescence et observées par microscopie confocale tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Images analysées avec Zeiss LSM Image Browser. Les fibroblastes sont marqués par l'anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$  et apparaissent en vert tandis que les cardiomyocytes sont identifiés par une absence de marquage avec ce même anticorps. Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3. Les flèches blanches indiquent deux fibroblastes ventriculaires de rats néonataux collagène  $\alpha 1$   $^{(+)}$  nestine  $^{(+)}$ . La flèche jaune indique un myocyte ventriculaire de rats néonataux binucléé collagène  $\alpha 1$   $^{(-)}$  nestine  $^{(+)}$ . Les flèches vertes indiquent deux myocytes ventriculaire de rats néonataux collagène  $\alpha 1$   $^{(-)}$  nestine  $^{(-)}$ .





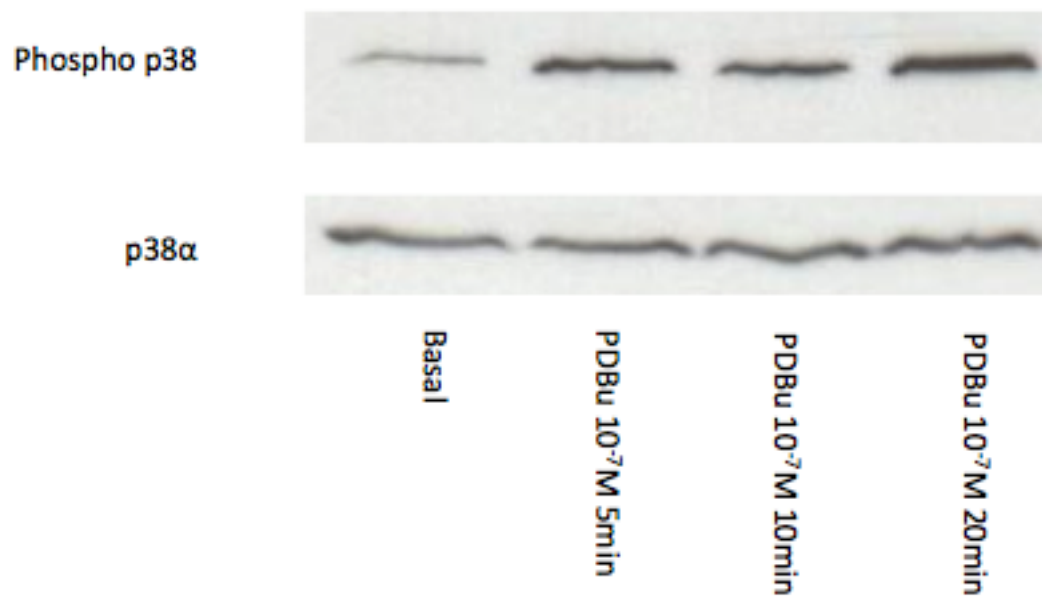
**Figure 8 : Cellules ventriculaires de rats néonataux marquées avec le collagène  $\alpha 1$  (fluorescence verte), nestine (fluorescence rouge), DAPI (fluorescence bleue) :** Les cellules ont été marquées par immunofluorescence et observées par microscopie confocale tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Images analysées avec Zeiss LSM Image Browser. Le fibroblaste est marqué par l'anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$  et apparaît en vert tandis que le cardiomyocyte est identifié par une absence de marquage avec ce même anticorps. Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3. Partie A) Marquage collagène  $\alpha 1$  (fluorescence verte) et DAPI (fluorescence bleue). Partie B) Marquage nestine (fluorescence rouge) et DAPI (fluorescence bleue). Partie C) Superposition des signaux. Présence d'un fibroblaste collagène  $\alpha 1$   $^{(+)}$  nestine  $^{(+)}$  binucléé et d'un cardiomyocyte de forme allongée collagène  $\alpha 1$   $^{(-)}$  nestine  $^{(+)}$ .

## **Nestine est exprimée dans les fibroblastes et les myocytes ventriculaires de rats néonataux**

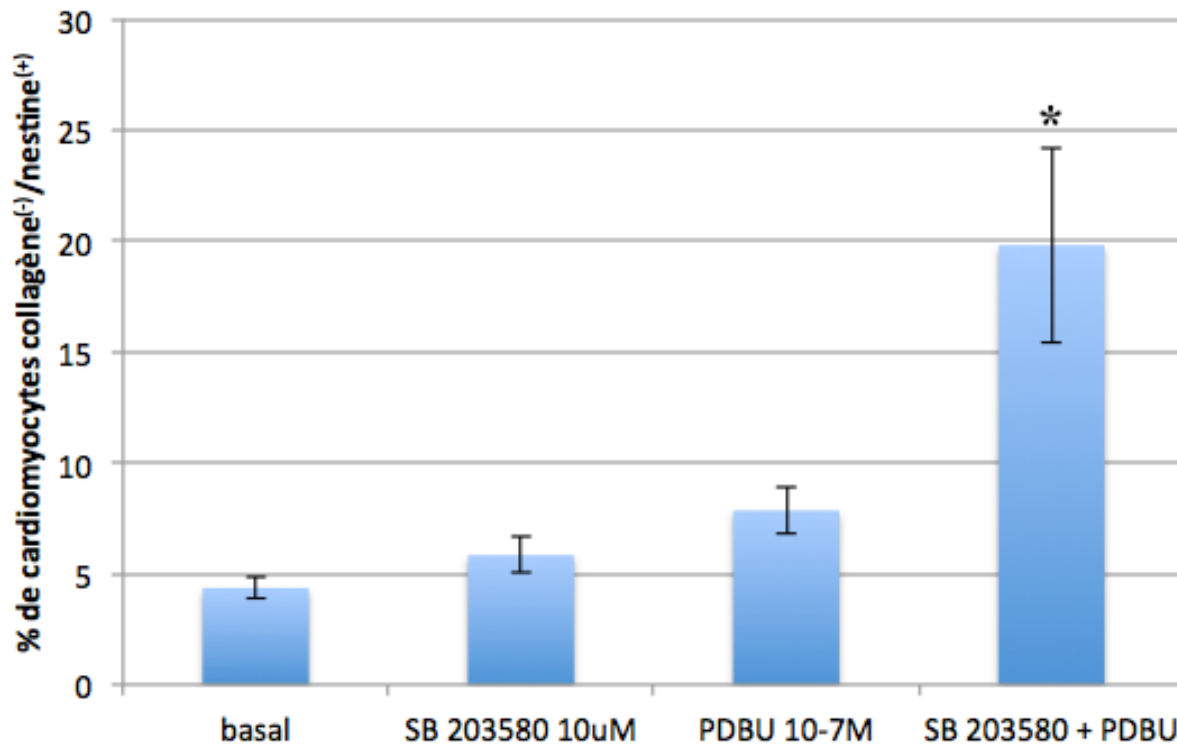
Dans les cellules non stimulées, seulement  $4,36 \pm 0,47\%$  des myocytes ventriculaires collagène  $\alpha 1^{(-)}$  exprimaient nestine. Après une stimulation de 24h avec l'activateur des protéines kinases C, le PDBu  $10^{-7}\text{M}$ , le pourcentage de cardiomyocytes nestine  $(+)$  a augmenté modestement, mais n'a pas atteint une différence statistiquement significative (PDBu  $10^{-7}\text{M}$  :  $7,85 \pm 1,04\%$ ). Un résultat analogue a été observé à la suite de la stimulation de 24heures avec le FBS 10% (FBS 10% :  $8,52 \pm 1,44\%$ ).

## **L'inhibition des voies p38 MAPK mène à l'augmentation des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> :**

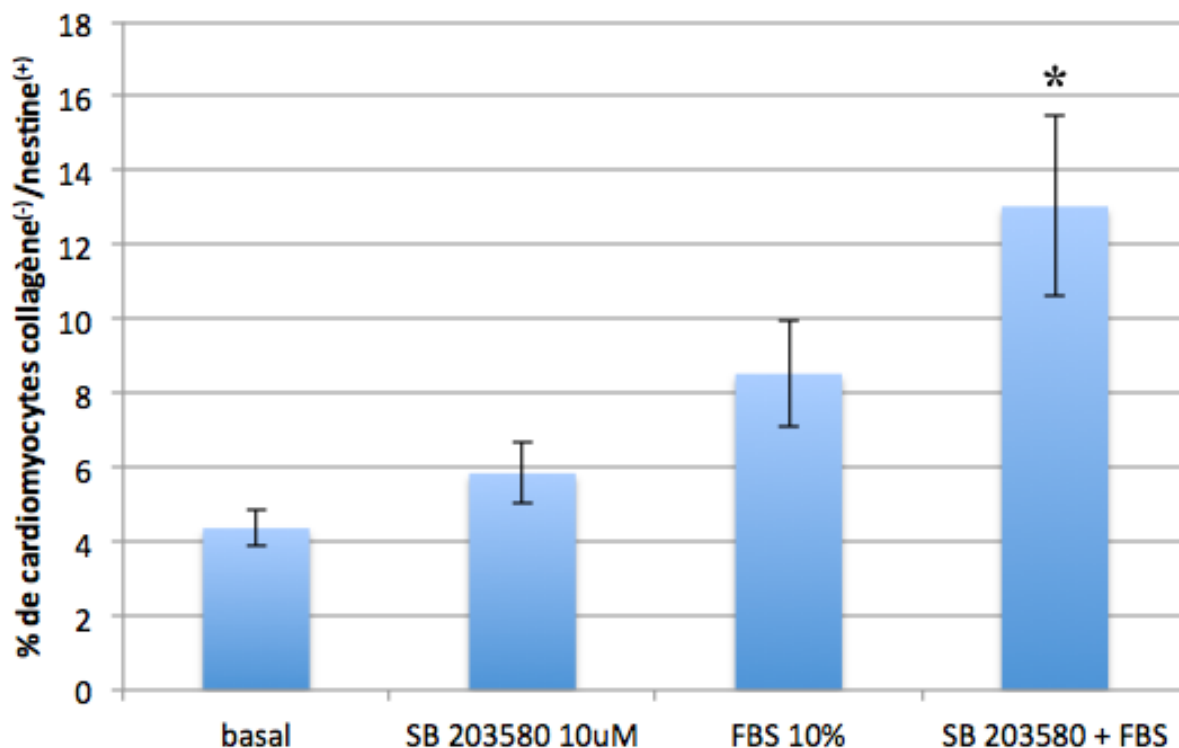
Le traitement des myocytes ventriculaires de rats néonataux avec PDBu a mené à la phosphorylation de la p38 MAPK (Figure 9). Les cellules ventriculaires de rats néonataux ont été traitées avec le SB203580, un inhibiteur établi de p38. Le SB203580 seul n'a pas d'effet, toutefois SB + PDBu a mené à une augmentation (Figure 10). Une approche similaire a été utilisée avec le FBS, le pourcentage de myocytes ventriculaires exprimant nestine a également augmenté en ajoutant l'inhibiteur de p38 (Figure 11). L'efficacité du SB203580 sur l'inhibition de la phosphorylation de la p38 MAPK induite par le PDBu a été testé sur une population pure de fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (Figure 12). Le traitement des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux avec PDBu a mené à la phosphorylation de la p38 MAPK, le niveau de phosphorylation a atteint son sommet à 5min et a par la suite diminué. Le prétraitement d'une heure des NNVF de rats avec le SB 203580 a permis l'inhibition partielle de la phosphorylation de la p38 MAPK induit par PDBu à 5min.



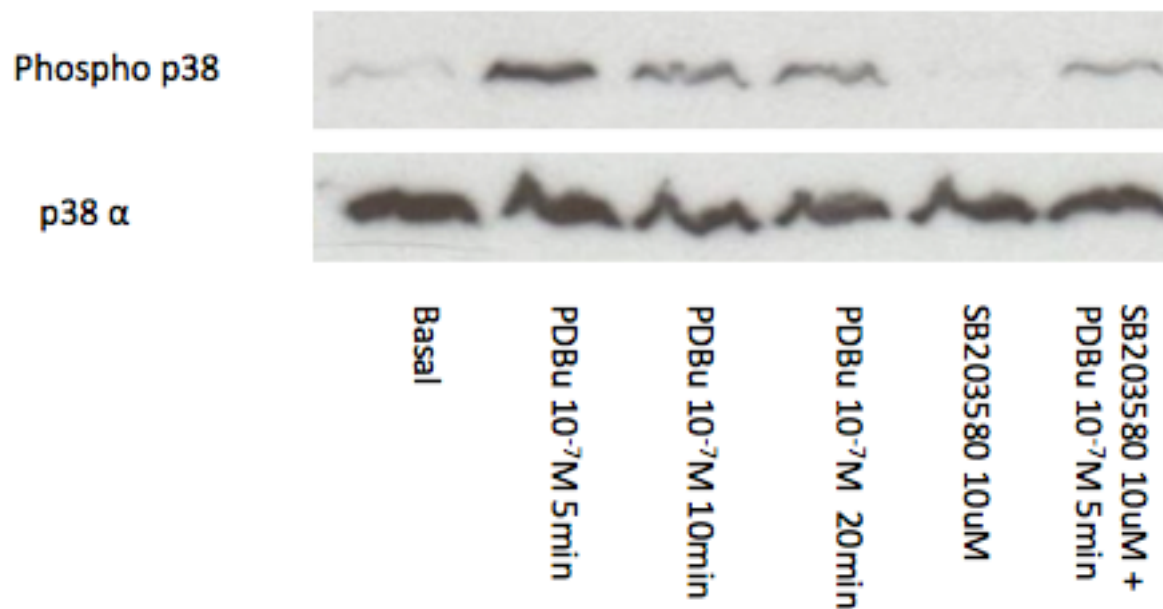
**Figure 9 : Effet du PDBu sur la phosphorylation de la p38 MAPK au niveau des cellules ventriculaires de rats néonataux :** Le traitement des cellules ventriculaires de rats néonataux avec l'activateur établi des voies PKC dépendantes, le PDBu  $10^{-7}$ M, mène à une augmentation de la phosphorylation de la p38 MAPK. Le p38 $\alpha$  a servi de contrôle pour le dosage protéique puisque son expression n'est pas affectée par le traitement avec le PDBu (n=3).



**Figure 10 : Effet de la stimulation *in vitro* des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'expression protéique de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$ :** La stimulation des voies PKC et l'inhibition des voies p38 a permis de constater par immunofluorescence/microscopie confocale l'augmentation protéique de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués négativement par l'absence de collagène  $\alpha 1$  (n= 4-5,\*  $p \leq 0,05$  vs basal).



**Figure 11: Effet de la stimulation in vitro du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'expression protéique de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$ : La stimulation avec FBS 10% combiné à l'inhibition des voies p38 a permis de constater par immunofluorescence/microscopie confocale l'augmentation protéique de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués négativement par l'absence de collagène  $\alpha 1$  (n= 4-5,\*  $p \leq 0,05$  vs basal).**



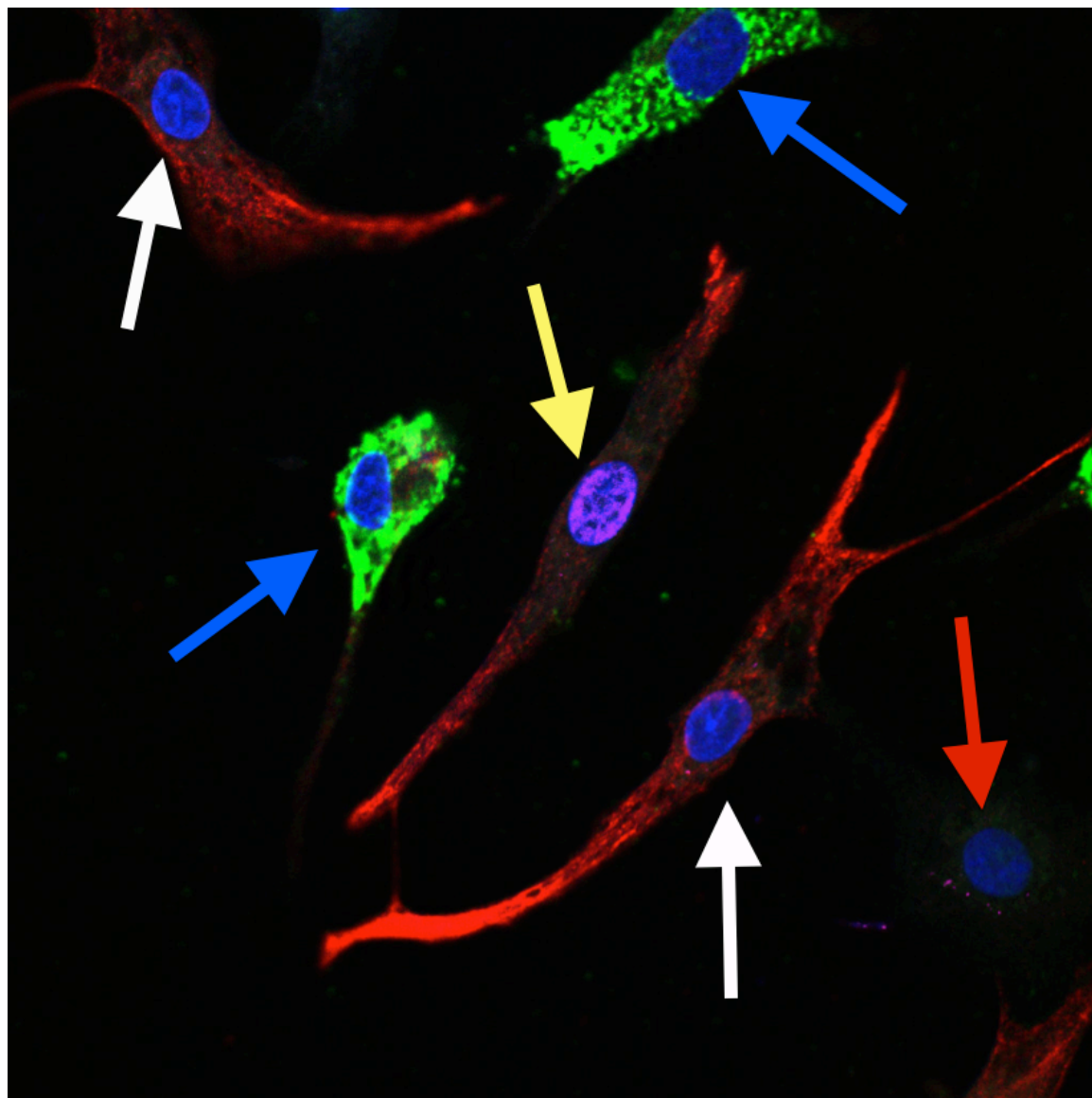
**Figure 12 : Effet du PDBu et du SB203580 sur la phosphorylation de la p38 MAPK au niveau des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux :** Le traitement des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux avec l'activateur établi des voies PKC dépendantes, le PDBu 10<sup>-7</sup>M, mène à une augmentation de la phosphorylation de la p38 MAPK et le SB203580 10uM bloque partiellement cette phosphorylation. Le p38α a servi de contrôle pour le dosage protéique puisque son expression n'est pas affectée par le traitement au PDBu et au SB203580 (n=3).

## **Les cellules ventriculaires de rats néonataux nestine<sup>(+)</sup> peuvent incorporer BRDU**

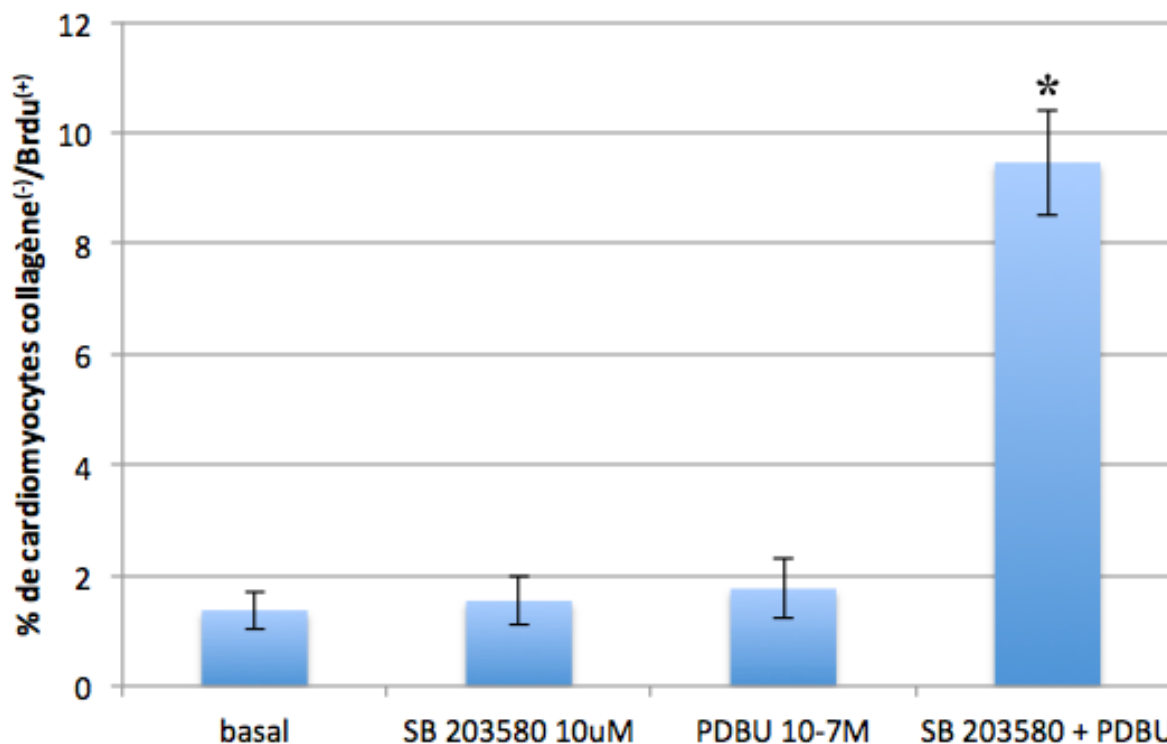
À la suite de l'augmentation de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux, nous nous sommes intéressés à savoir quel était le rôle de nestine dans ces cellules. Diverses études ont démontré par le passé que nestine joue un rôle dans la prolifération cellulaire (Calderone, 2012). Dans les cellules non stimulées, seulement  $1,37 \pm 0,34\%$  des myocytes ventriculaires collagène  $\alpha 1$ <sup>(-)</sup> incorporaient BRDU (Figure 13). Le cotraitement des cellules ventriculaires de rats néonataux avec le PDBu et le SB203580 a mené à une augmentation significative du pourcentage de myocytes ventriculaires de rats néonataux incorporant BRDU (Figure 14). Un résultat analogue a été observé à la suite d'une stimulation de 24h avec le FBS 10% lorsque combiné à l'action du SB203580 (Figure 15). Il est intéressant de noter que les stimulations seules via PDBu, SB203580 ou FBS n'ont pas mené à une augmentation significative du pourcentage de myocytes ventriculaires de rats néonataux incorporant BRDU. Les Figures 10, 11, 14 et 15 démontrent que dans ces cellules, les variations observées dans l'incorporation de BRDU et dans l'expression de nestine étaient similaires et en réponse aux mêmes traitements. Afin de parfaire la caractérisation de notre modèle *in vitro*, nous avons voulu nous assurer que les cardiomyocytes identifiés négativement par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène collagène  $\alpha 1$  ainsi que ceux marqués par un marquage positif avec un anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque (Figures 16 et 17) suivait le même patron d'incorporation de BRDU. Ce patron d'expression commun avec les différents marquages nous a permis de confirmer que bien qu'il n'eût été possible d'identifier les cardiomyocytes par un marquage positif lorsque l'on ciblait nestine, la population cellulaire ciblée était bel et bien les myocytes ventriculaires de rats néonataux. Étant donné le rôle prolifératif attribué à nestine, nous avons regardé si l'augmentation de nestine via la combinaison du SB203580 10uM avec le PDBu  $10^{-7}$ M augmentait le pourcentage de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> actif dans la phase S du cycle cellulaire. Le pourcentage de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> incorporant BRDU est passé de  $1,7\% \pm 0,9\%$  à l'état basal à  $23\% \pm 5\%$  lorsque traité avec SB203580 et PDBu (Figure 18). Un résultat analogue a été observé avec la stimulation du FBS et du SB 203580 (Figure 19). L'augmentation de nestine dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux corrélait donc avec une entrée accrue des myocytes ventriculaires nestine<sup>(+)</sup> de rats néonataux dans la phase S du cycle cellulaire. En revanche, les



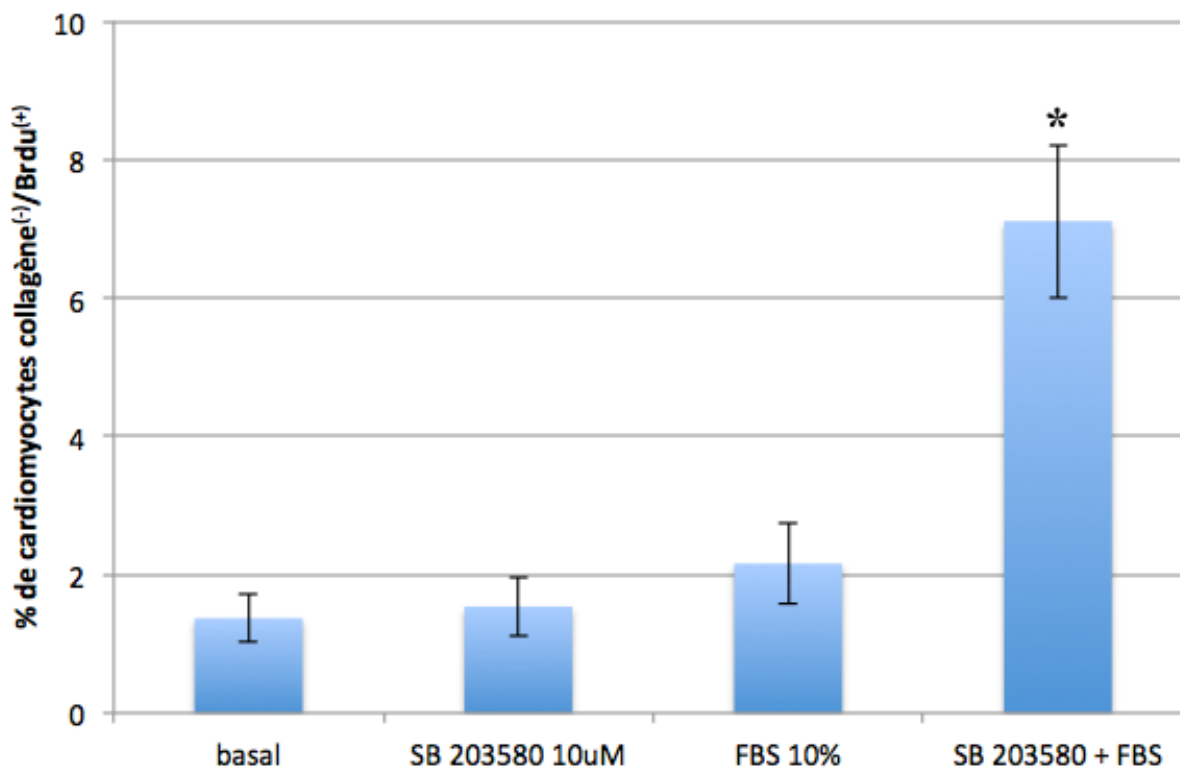
mécanismes de régulation de la synthèse d'ADN n'ont pas été conservés dans l'évolution entre les cellules ventriculaires de rats néonataux. Tel que le démontre la Figure 20, la stimulation des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux avec le SB + PDBu a plutôt mené à une diminution de l'incorporation de BRDU et donc à une diminution de la synthèse d'ADN. La stimulation seule via PDBu a également mené à une diminution du nombre de fibroblastes collagène  $\alpha 1$  <sup>(+)</sup> incorporant BRDU.



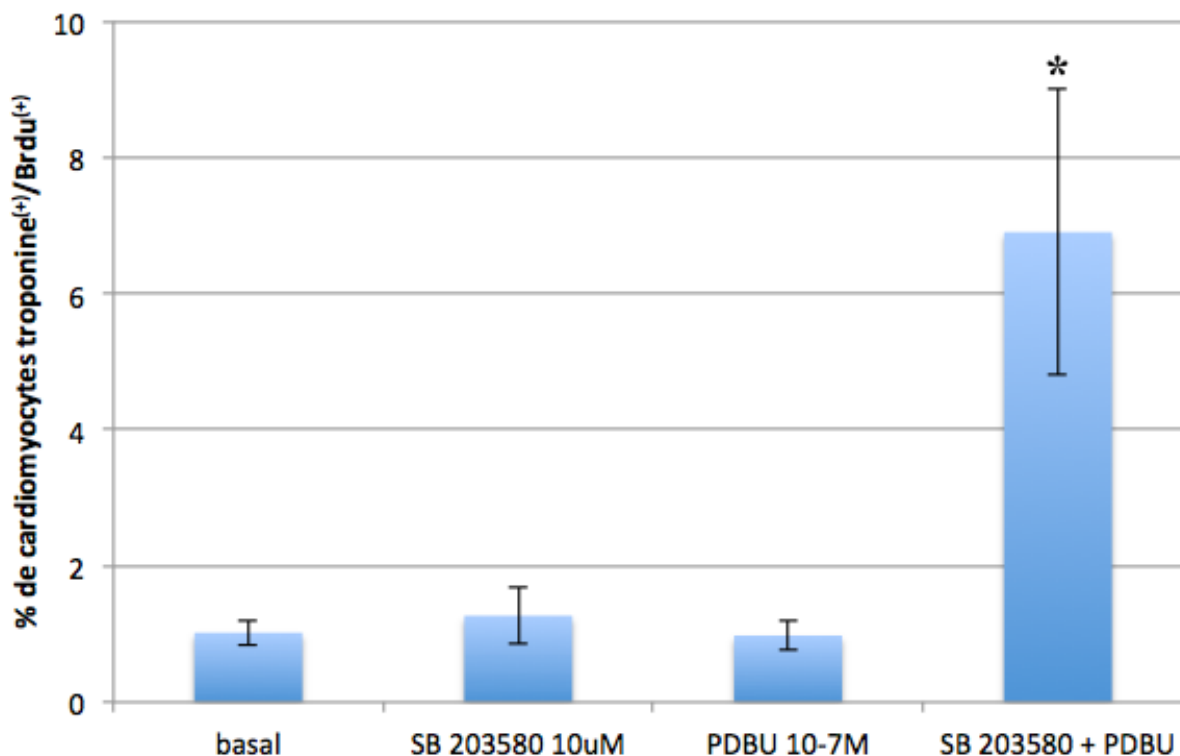
**Figure 13 : Population hétérogène de cellules ventriculaires de rats néonataux marqués avec le collagène  $\alpha 1$  (fluorescence verte), nestine (fluorescence rouge), BRDU (fluorescence mauve) et DAPI (fluorescence bleue) :** Les cellules ont été marquées par immunofluorescence et observées par microscopie confocale tel que décrit dans Matériel et Méthodes. Images analysées avec Zeiss LSM Image Browser. Les flèches blanches indiquent les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup>/BRDU<sup>(-)</sup>, la flèche jaune indique un cardiomyocyte nestine<sup>(+)</sup>/BRDU<sup>(+)</sup>, la flèche rouge indique un cardiomyocyte nestine<sup>(-)</sup>/BRDU<sup>(-)</sup>, et les flèches bleues indiquent des fibroblastes BRDU<sup>(-)</sup>. Les noyaux (fluorescence bleue) sont marqués avec un marqueur d'acide nucléique, le TO-PRO®3.



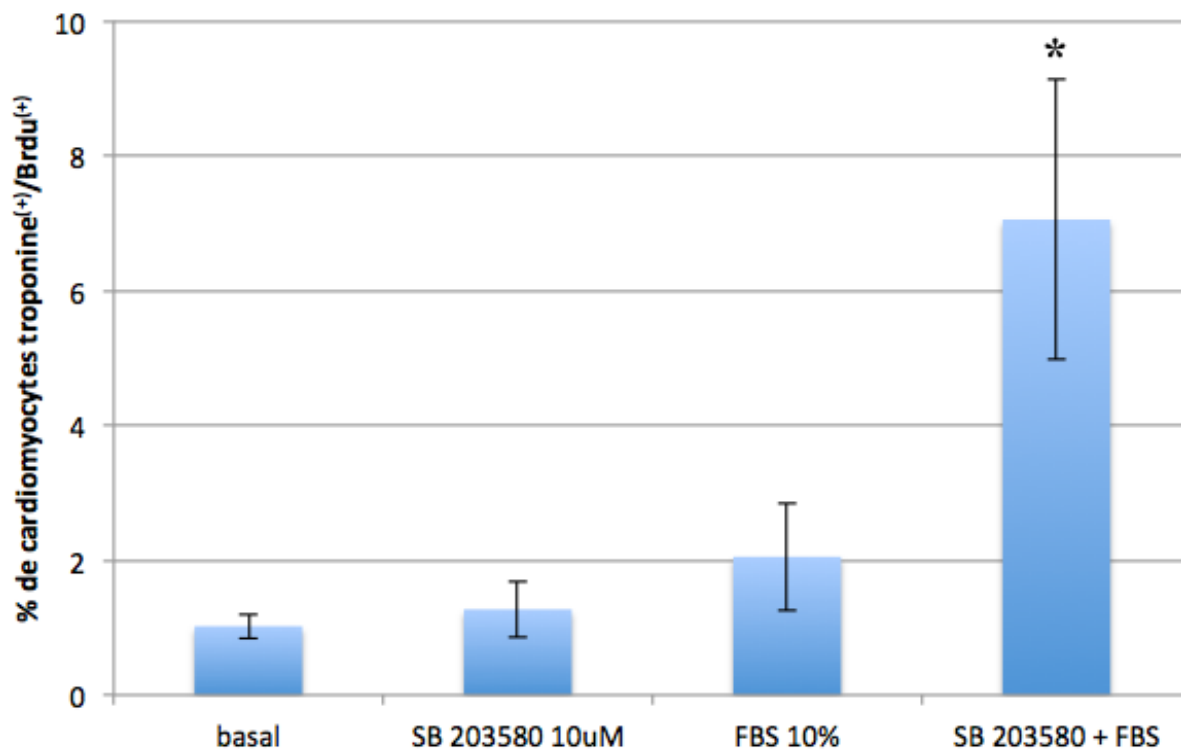
**Figure 14 : Effet de la stimulation *in vitro* des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$ : La stimulation des voies PKC via le PDBu  $10^{-7}$ M combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une augmentation du nombre de cardiomyocytes incorporant BRDU dans leur noyau (n= 4-5,\*  $p \leq 0,05$  vs basal).**



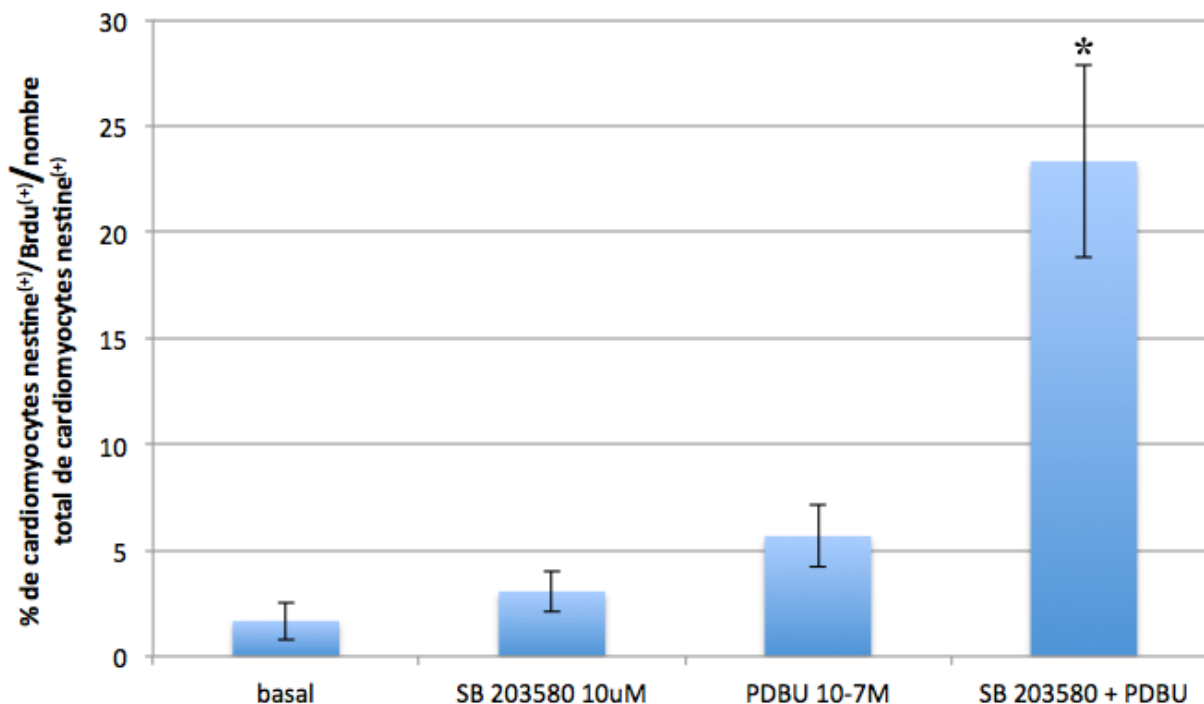
**Figure 15 : Effet de la stimulation *in vitro* du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$ : La stimulation avec le FBS 10% combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une augmentation du nombre de cardiomyocytes incorporant BRDU dans leur noyau (n= 4-5,\*  $p \leq 0,05$  vs basal).**



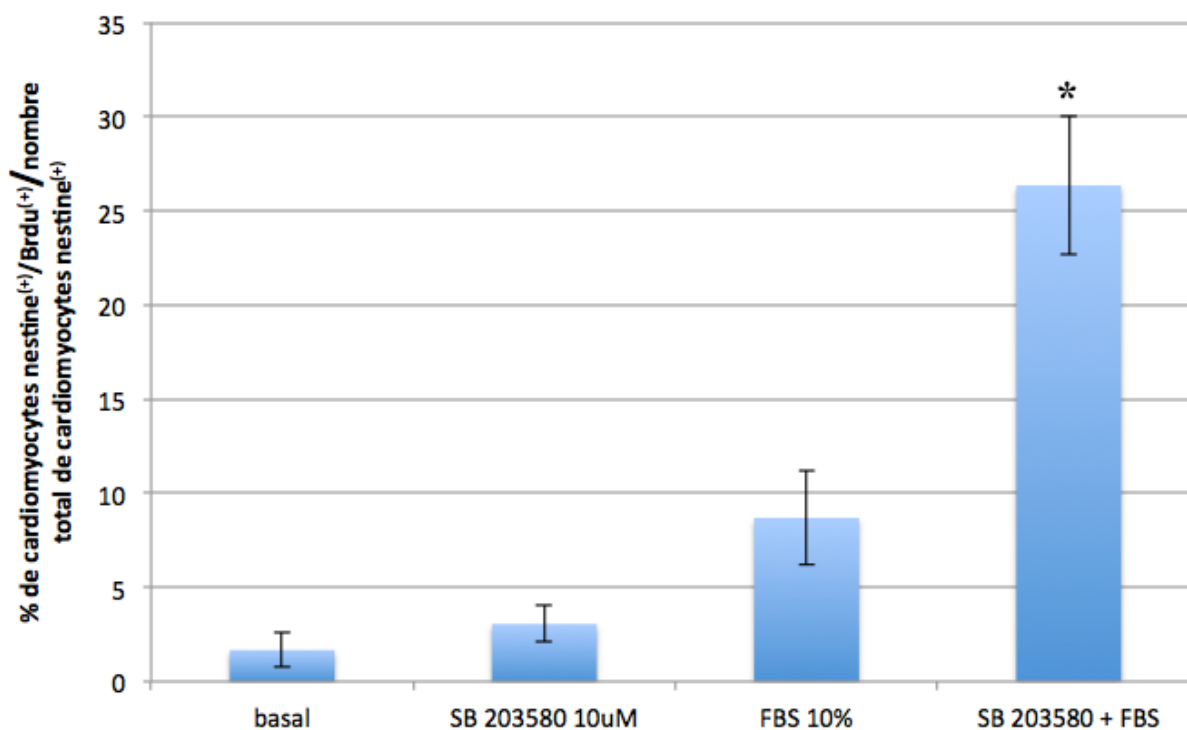
**Figure 16 : Effet de la stimulation *in vitro* des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués via un anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque :** La stimulation des voies PKC via le PDBu 10<sup>-7</sup>M combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une augmentation du nombre de cardiomyocytes troponine T cardiaque<sup>(+)</sup> incorporant BRDU dans leur noyau (n= 4-5, \* p≤ 0,05 vs basal).



**Figure 17 : Effet de la stimulation *in vitro* du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes de rats néonataux marqués avec un anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque : La stimulation avec le FBS 10% combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une augmentation du nombre de cardiomyocytes troponine T cardiaque <sup>(+)</sup> incorporant BRDU dans leur noyau (n= 4-5,\* p ≤ 0,05 vs basal).**

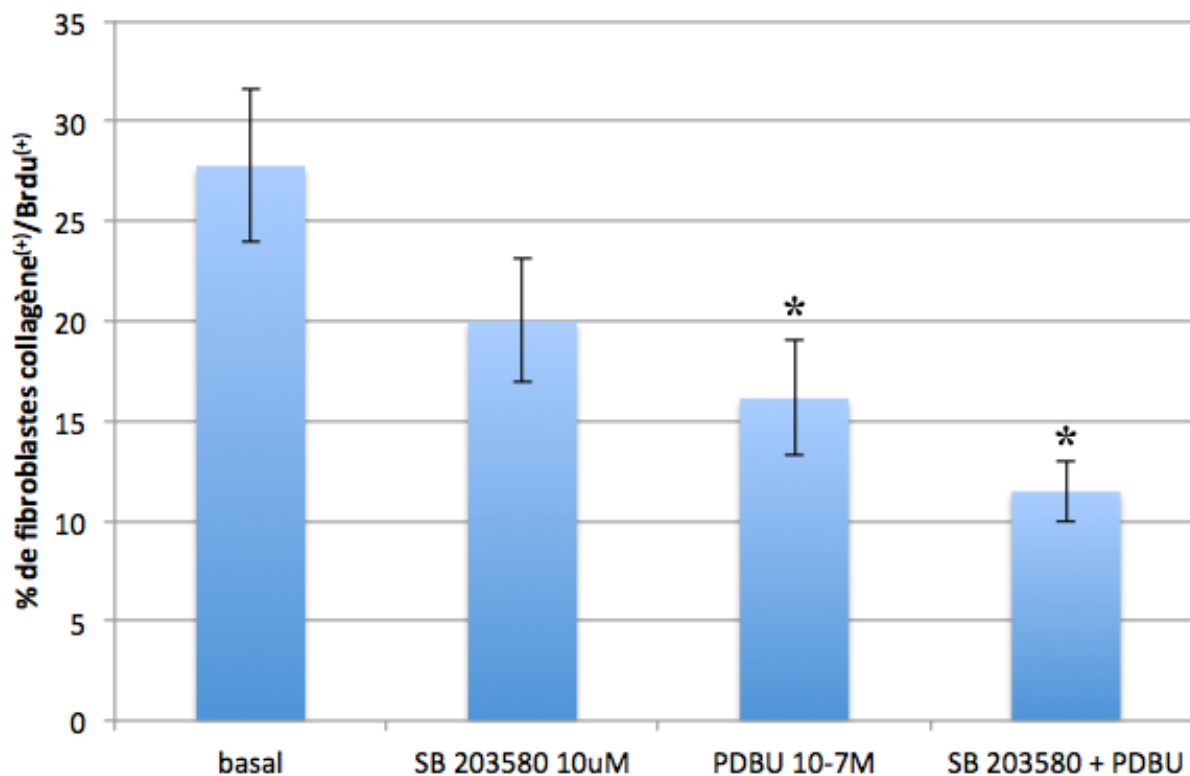


**Figure 18 : Effet de la stimulation *in vitro* des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> de rats néonataux identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$  : La stimulation des voies PKC via le PDBu 10<sup>-7</sup>M combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une augmentation de l'incorporation nucléaire de BRDU dans les cardiomyocytes collagène  $\alpha 1$ <sup>(-)</sup>/ nestine<sup>(+)</sup> (n= 4-5,\* p $\leq$  0,05 vs basal).**



**Figure 19 : Effet de la stimulation *in vitro* du FBS 10% et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> de rats néonataux identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$  : La stimulation avec le FBS 10% combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une augmentation de l'incorporation nucléaire de BRDU dans les cardiomyocytes collagène  $\alpha 1$ <sup>(-)</sup> / nestine<sup>(+)</sup> (n= 4-5,\* p $\leq$  0,05 vs basal).**

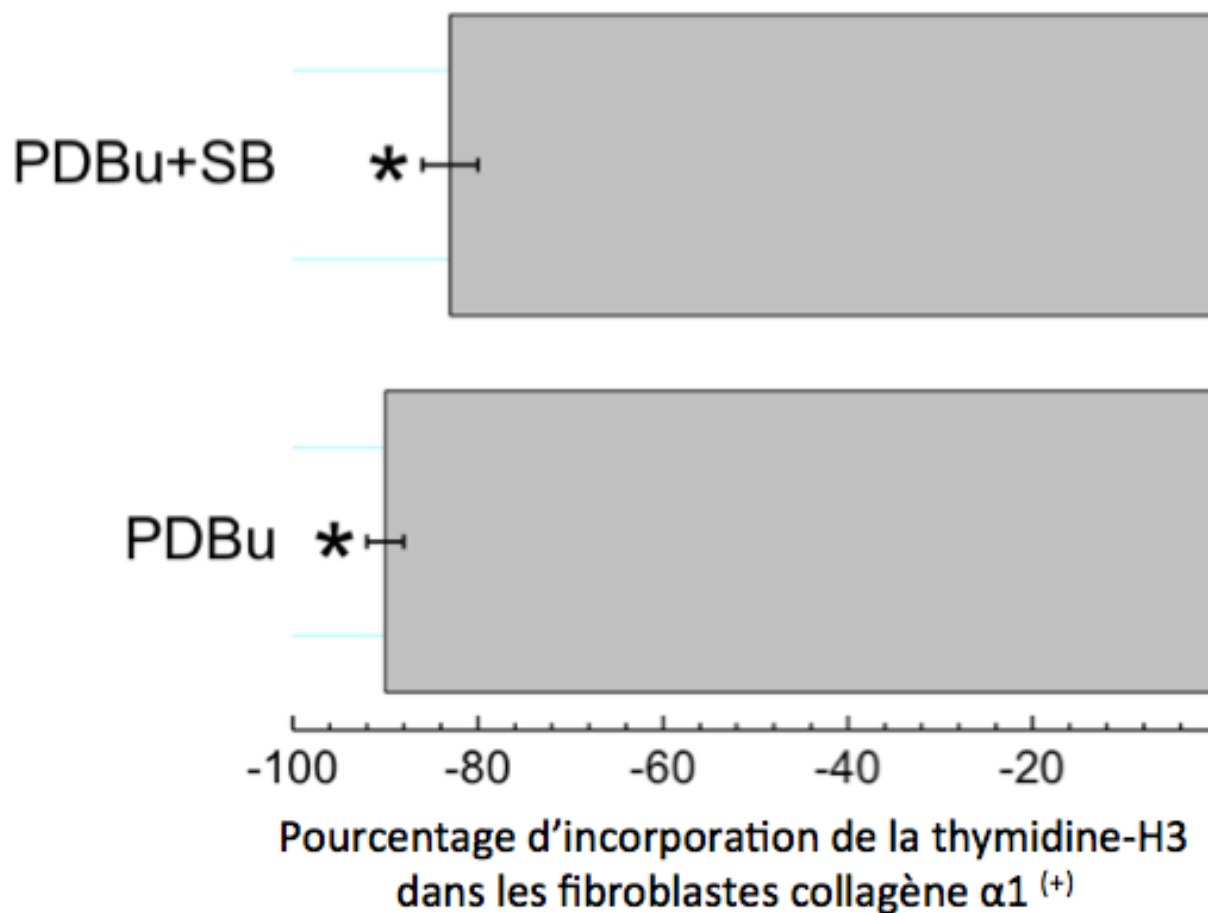




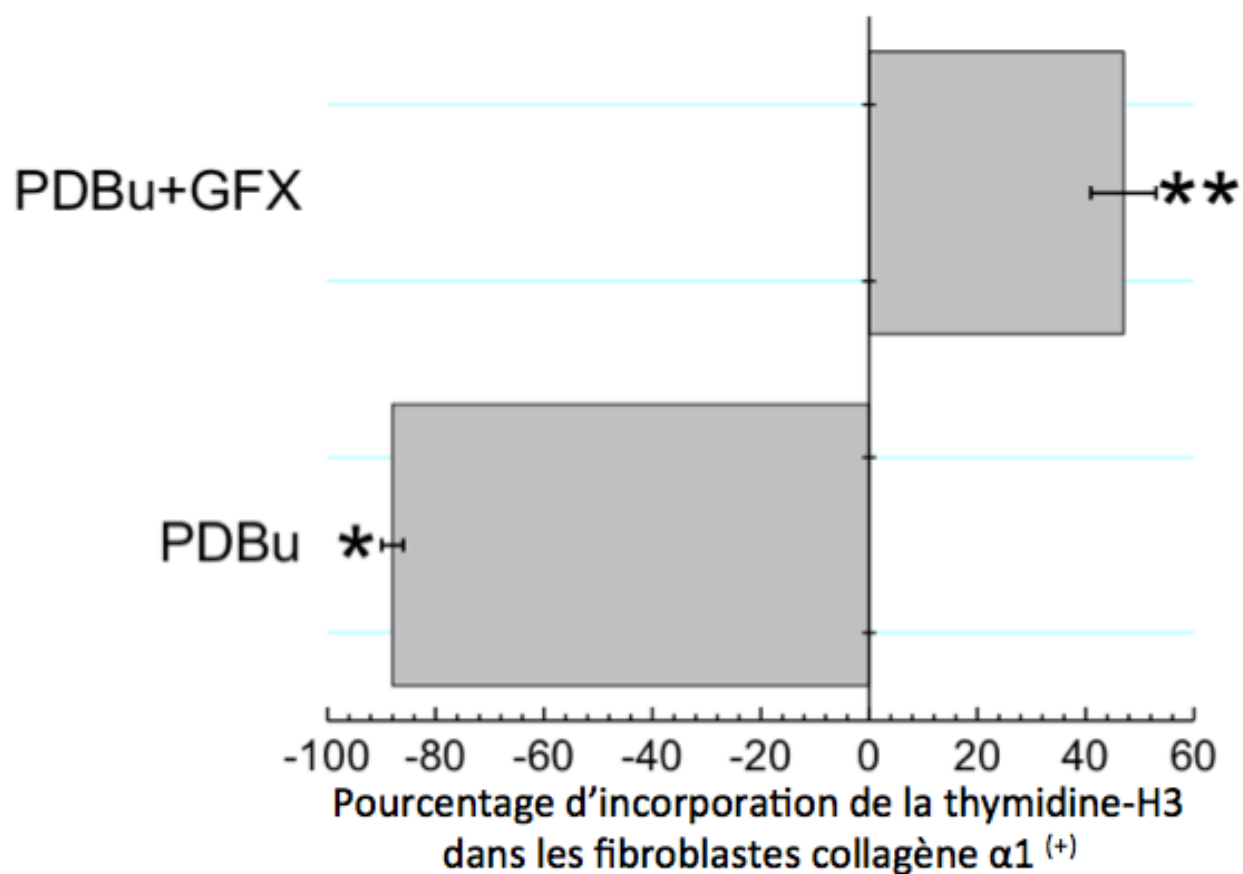
**Figure 20 : Effet de la stimulation *in vitro* des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur l'incorporation de BRDU dans les fibroblastes cardiaques de rats néonataux marqués via un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$ :** La stimulation des voies PKC via le PDBu 10 $^{-7}$ M seul ou combiné à l'action inhibitrice du SB203580 10uM sur les voies p38 a mené à une diminution du nombre de fibroblastes collagène  $\alpha 1$   $^{(+)}$  incorporant BRDU dans leur noyau (n= 4-5, \*  $p \leq 0,05$  vs basal).

## **Vérification des résultats obtenus par BRDU:**

Étant donné qu'il nous était impossible d'isoler une population pure de cardiomyocytes et que l'interprétation de résultats sur une population cellulaire hétérogène est ardue, des isolations pures de fibroblastes cardiaques de rats néonataux ont servi à confirmer les résultats obtenus par BRDU. Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que la diminution du pourcentage de fibroblastes ventriculaires collagène  $\alpha 1^{(+)}$  de rats néonataux incorporant BRDU par le traitement seul au PDBu  $10^{-7}M$  ou combiner à l'action inhibitrice du SB203580 10uM était conservée via une autre méthode d'évaluation de la synthèse d'ADN, soit l'incorporation de la thymidine-H3 (Figure 21). Le traitement seul au PDBu  $10^{-7}M$  ou en combinaison avec le SB203580 10uM a mené à une diminution de l'incorporation de la thymidine-H3 dans les fibroblastes ventriculaires collagène  $\alpha 1^{(+)}$  de rats néonataux. Ces deux techniques d'évaluation de la synthèse d'ADN ont indiqué une diminution de l'activité des fibroblastes ventriculaires collagène  $\alpha 1^{(+)}$  de rats néonataux dans la phase S du cycle cellulaire à la suite du traitement au PDBu et au PDBu + SB 203580. La prochaine étape était de vérifier que le PDBu agissait via des voies PKC dépendantes. Ceci a été confirmé lorsque le GFX, un inhibiteur des PKC, a renversé la diminution de la synthèse d'ADN induite par le PDBu  $10^{-7}M$  (Figure 22).



**Figure 21 : Effet de la stimulation des voies PKC et de l'inhibition des voies p38 sur le pourcentage d'incorporation de la thymidine-H3 dans les fibroblastes collagène  $\alpha 1$  <sup>(+)</sup> ventriculaires de rats néonataux:** L'activateur des PKC, le PDBu 10-7M, seul ou en combinaison avec l'inhibiteur des voies p38, le SB 203580 10uM a entraîné une diminution de la synthèse d'ADN dans les fibroblastes collagène  $\alpha 1$  <sup>(+)</sup> ventriculaires de rats néonataux tel qu'évaluée par incorporation de la thymidine-H3 par rapport à une population non stimulée de ce type cellulaire (n =3-4, \* p $\leq$ 0,05).



**Figure 22 : Effet de l'inhibition des voies PKC sur le pourcentage d'incorporation de la thymidine-H3 dans les fibroblastes ventriculaires collagène  $\alpha 1^{(+)}$  de rats néonataux à la suite d'une stimulation au PDBu  $10^{-7}M$  :** La diminution de la synthèse d'ADN induite par le PDBu  $10^{-7}M$  dans les fibroblastes collagène  $\alpha 1^{(+)}$  ventriculaires de rats néonataux a été renversée par un prétraitement d'une heure avec un inhibiteur des PKC, le GFX  $10^{-6}M$ , tel qu'évaluée par incorporation de la thymidine-H3 par rapport à une population non stimulée de ce type cellulaire (n =3-4, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  ).

**Discussion :**

Un infarctus du myocarde se produit à la suite de l'occlusion d'une artère coronaire. Ce processus pathologique a plusieurs répercussions délétères sur l'organisme dont la mort des cardiomyocytes situés en amont de l'occlusion. Par le passé, le groupe de Scobioala a démontré qu'à la suite d'un infarctus du myocarde, il y a augmentation de l'ARNm de nestine dans la partie non-infarctée du ventricule gauche ainsi que dans la région cicatricielle (Calderone, 2012; Scobioala et al., 2008). Afin de vérifier que l'ARNm synthétisé était bel et bien traduit en protéine avant d'être dégradé, l'équipe du Dr Calderone a regardé nestine dans le cœur infarcté de rats adultes. Ce qu'ils ont constaté, c'est que chez ces rats, l'augmentation protéique de nestine était localisée principalement dans les cardiomyocytes de la zone infarctée et de la zone péri-infarctée. Il y avait toutefois également présence d'une population modeste de cardiomyocytes exprimant nestine sous sa forme striée dans le ventricule gauche non infarcté de ces rats (Figure 1). L'ARNm synthétisé à la suite d'un infarctus du myocarde est donc traduit en protéine avant d'être dégradé, et nestine dans les myocytes cardiaques est principalement localisée à la zone infarctée/péri-infarctée.

Bien que la présence de striation chez les cellules cardiaques est caractéristique des cardiomyocytes, nous voulions confirmer que les cellules striées qui exprimaient nestine étaient bel et bien des cardiomyocytes via un marqueur fortement exprimé dans ces derniers. Nous avons donc eu recours à une filamenteuse intermédiaire retrouvée dans le muscle strié cardiaque, la desmine. Tel qu'illustré à la Figure 2, les cellules striées cardiaques expriment également la desmine. Grâce à leur phénotype strié et leur expression de desmine, nous avons confirmé que ces cellules étaient bel et bien des cardiomyocytes. Il est toutefois important de noter la présence de cellules nestine<sup>(+)</sup> non striées ayant la morphologie de fibres neurales (Figure 1), bien que ce ne soit pas le sujet de mon étude, cela nous a permis de constater que nous étions en présence d'une population hétérogène de cellules cardiaques nestine<sup>(+)</sup>.

Une fois que la présence de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> ait été confirmée, la question de leur origine a été soulevée. Par le passé, le groupe de Tomita a suggéré qu'une population de cellules souches/progénitrices neurale résidente cardiaque avait la possibilité de se différencier en cardiomyocytes (Tomita et al., 2005). Notre première hypothèse fut que les cellules décrites par le groupe de Tomita étaient à l'origine des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> que l'on observait à la suite d'un infarctus du myocarde. Afin de tester cette hypothèse, nous avons eu recours aux souris transgéniques nestine/GFP initialement créé par le Dr Enikolopov. GFP dans ce type de souris transgéniques, marque les cellules qui expriment nestine via ce second intron. L'étude de ces souris chez lesquelles nous avons provoqué un infarctus du myocarde a permis la détection de cellules ventriculaires coexprimant nestine et GFP intercalées entre les cardiomyocytes (Figures 3 et 4). En revanche, bien qu'il y avait présence de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup>, aucun n'exprimait le gène rapporteur GFP (Figure 5). Dans les cellules souches neurales en prolifération, nestine est régulée via des amplificateurs situés dans le second intron. Puisqu'aucun cardiomyocyte n'exprimait GFP, nous avons pu affirmer que nestine n'était pas régulée via le second intron dans ces cellules et qu'il ne s'agit pas d'une population de cellules souches fraîchement différenciée en cardiomyocytes. Puisque les cellules souches cardiaques n'étaient pas à l'origine des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> que nous apercevions à la suite d'un infarctus du myocarde, nous nous sommes tournés vers une seconde option. Était-il possible que ce soit une population endogène de cardiomyocytes qui en réponse à un dommage cardiaque, avait la possibilité de ré-exprimer nestine. Étant donné le rôle prolifératif attribué à nestine, nous nous sommes questionnés à savoir si les myocytes ventriculaires nestine<sup>(+)</sup> représentent une sous-population de cardiomyocytes réentrant dans le cycle cellulaire. Il a déjà été démontré par le passé que les myocytes ventriculaires de rats néonataux ont une capacité limitée de réentrer dans le cycle cellulaire (Li, Wang, Bunger, et al., 1997). À partir de ces résultats, nous avons voulu savoir s'il était possible de détecter nestine dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux et si ces cellules étaient capables de réentrer dans le cycle cellulaire en réponse à une stimulation adéquate. L'isolation de cellules ventriculaires de rats néonataux a permis la mise en culture de deux types cellulaires, les fibroblastes et les myocytes ventriculaires. À l'état basal, seul un faible pourcentage des fibroblastes et des myocytes ventriculaires de rats néonataux exprimaient nestine. Le phénotype des fibroblastes a été confirmé par immunofluorescence/microscopie confocale par un marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$ . Une expérience analogue a été effectuée pour

confirmer le phénotype des myocytes ventriculaires. Dans un premier temps ils ont été identifiés par l'absence de marquage avec un anticorps dirigé contre le collagène  $\alpha 1$  puis par la présence de marquage avec un anticorps dirigé contre la troponine T cardiaque.

Le groupe du Dr Lu avait démontré par le passé que certains facteurs de croissance ont la possibilité de stimuler la prolifération des myocytes ventriculaires de rats néonataux via le recrutement des voies PKC dépendantes (Lu et al., 2008). Par ailleurs, plusieurs groupes ont rapporté les effets prolifératifs attribuables aux voies activées par les protéines kinases C (Bel Hadj, 2004; Martelli et al., 2003). Notre première tentative de stimulation de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux fut avec le PDBu, un phorbol ester qui est un puissant activateur des protéines kinases C. Les fibroblastes furent marqués avec l'anticorps anti-collagène  $\alpha 1$ , tandis que les cardiomyocytes furent identifiés par leur absence de marquage avec ce même anticorps. Les figures 6, 7 et 8 illustrent ce marquage. Comme le démontre ces figures, nestine est également présente chez les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux, il est donc essentiel de toujours réaliser un marquage collagène  $\alpha 1$  afin de différencier ces deux populations. Bien qu'il y ait eu une légère tendance, l'augmentation de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> induite par la stimulation au PDBu ne fût pas statistiquement significative par rapport au basal. En parallèle et dans le but de servir de contrôle positif, les cellules ventriculaires cardiaques de rats néonataux furent stimulées avec le FBS 10%, un activateur connu de la prolifération cellulaire. Un résultat analogue fut observé à la suite de la stimulation de 24 heures avec le FBS 10%. Il est possible que l'augmentation de la taille de nos échantillons ait permis d'atteindre des différences statistiquement valables, toutefois nous voulions trouver un mécanisme capable de stimuler encore plus fortement l'expression de nestine dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux.

Il n'a pas été possible de faire un marquage positif pour les cardiomyocytes lors de ces expériences puisque notre anticorps dirigé contre nestine et celui dirigé contre la troponine T cardiaque sont synthétisés chez la souris. En recherche, la troponine T cardiaque est souvent utilisée comme marqueur des cardiomyocytes. L'utilisation d'un anticorps secondaire dirigé contre la souris les aurait alors tous deux marqués et il aurait été impossible de les distinguer. De plus, nous avons essayé des anticorps anti-troponine T cardiaque et anti-nestine synthétisés chez d'autres animaux, mais aucun d'entre eux ne donnaient un marquage aussi clair que ceux



synthétisés chez la souris. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la phalloïdine a aussi été envisagée puisque celui-ci est directement combiné à une molécule fluorescente. Toutefois, la phalloïdine marque l'actine et cette dernière est présente autant chez les cardiomyocytes que chez les fibroblastes cardiaques de rats néonataux. Il aurait donc fallu observer les cellules à 63X afin de distinguer le signal strié des cardiomyocytes par rapport au signal filamenteux des fibroblastes lorsque marqués avec la phalloïdine. Toutefois, mon étude nécessitait de prendre en compte une quantité faramineuse de cellules, l'utilisation d'un objectif 63X n'était donc pas envisageable.

Étant donné l'échec quant à l'augmentation de nestine via une stimulation des voies PKC, je me suis demandé si l'activation d'une autre voie pourrait mener à l'augmentation de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux. Des études sur des modèles animaux ont démontré que le p38  $\alpha$  est activé durant l'ischémie myocardique, que l'administration de bloqueurs pharmacologiques de p38 peut permettre de diminuer la taille de l'infarctus et que le p38  $\alpha$  augmente l'expression de gènes associés à la fibrose (Denise Martin, De Nicola, & Marber, 2012; Koivisto et al., 2011; Kumphune et al., 2010; Ma et al., 1999). Étant donné que généralement la réduction de la taille de la cicatrice est attribuable à une meilleure survie des cardiomyocytes ou à une réduction du processus fibrotique. J'ai émis l'hypothèse que l'inhibition des voies p38 MAPK menait à une augmentation de nestine dans les cardiomyocytes et que cette dernière favorisait leur prolifération permettant ainsi de réduire la taille de la zone infarctée. Toutefois, l'administration du SB203580 10uM n'eut pas l'effet escompté, il ne provoqua pas d'augmentation significative du nombre de cardiomyocyte nestine<sup>(+)</sup> par rapport au basal (SB203580 10uM  $5,84 \pm 0,83\%$ )

Je me suis alors tourné vers la littérature afin de comprendre pourquoi l'inhibition de p38 ne suffisait pas à l'atteinte de mes objectifs. Ce que j'ai constaté c'est qu'à travers plusieurs études, un bloqueur de p38 était administré aux cardiomyocytes en combinaison avec un facteur de croissance, et cette combinaison avait pour effet de stimuler la prolifération des cardiomyocytes (Engel et al., 2006; Engel et al., 2005). Ce que j'avais omis auparavant c'est qu'avec mon modèle *in vitro*, il ne m'était pas possible de recréer tous les facteurs présents *in vivo* ayant la capacité d'affecter l'expression de nestine dans les cardiomyocytes à la suite d'un infarctus du myocarde. En effet, en réponse à l'infarctus, il y a recrutement de cellules inflammatoires, relâche de facteurs de croissance et de noradrénaline (Calderone, 2012). Des études antérieures ont

démontré que les voies p38 inhibaient la prolifération des myocytes ventriculaires induite par des facteurs de croissance (Engel et al., 2006). Il était donc possible que le PDBu via ses effets prolifératifs stimule la prolifération des myocytes ventriculaires de rats néonataux, mais qu'il active parallèlement des voies p38 MAPK qui inhibaient cet effet. Basé sur ces études, nous avons regardé si la stimulation des cellules ventriculaires des rats néonataux via le PDBu entraînerait la phosphorylation de la p38MAPK. Tel qu'illustré à la Figure 9, le PDBu stimulait la phosphorylation de la p38 MAPK dans les cellules ventriculaires de rats néonataux. Cette stimulation est la raison pour laquelle nous avons décidé de traiter nos cellules ventriculaires de rats néonataux avec le SB203580, un inhibiteur établi de p38, et de regarder si la population de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> augmenterait avec la stimulation au PDBu. Tel que mentionné ci-haut, le SB203580 seul n'a pas d'effet, toutefois SB + PDBu a mené à une augmentation statistiquement significative du pourcentage de myocytes ventriculaires de rats néonataux exprimant nestine (Figure 10). Une approche similaire a été utilisée avec le FBS, le pourcentage de myocytes ventriculaires exprimant nestine a également augmenté en ajoutant l'inhibiteur de p38 (Figure 11). Afin de faciliter l'interprétation des résultats, l'efficacité du SB203580 sur l'inhibition de la phosphorylation de la p38 MAPK induite par le PDBu a été testé *in vitro* sur une population pure de fibroblastes ventriculaires de rats néonataux, plutôt que sur l'ensemble des cellules ventriculaires de rats néonataux. Le SB203580 est un inhibiteur des voies p38. L'isoforme de p38 la plus abondante dans le cœur est le p38 $\alpha$ , c'est donc celui-ci qui a retenu notre attention. Comme illustré à la Figure 12, la stimulation de la phosphorylation de p38 induite par le PDBU chez les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux est inhibée par un prétraitement au SB203580 10 $\mu$ M, toutefois la quantité totale de p38 $\alpha$  reste inchangée. Ceci démontre qu'à travers l'activation des voies PKC-dépendantes, le PDBu active des voies p38 et que cette stimulation est inhibée par un inhibiteur des voies p38, le SB203580.

Une façon d'augmenter le pourcentage de cardiomyocytes de rats néonataux exprimant nestine *in vitro* avait donc été trouvée. Toutefois, le rôle de nestine dans ces myocytes ventriculaires demeurait inconnu. Plusieurs papiers semblaient indiquer que nestine était présente dans les cellules en prolifération (Calderone, 2012; Zhao et al., 2014). Il n'était toutefois pas clair si nestine était un marqueur de prolifération ou si elle induisait la prolifération dans les cellules. Dans les cellules non stimulées, seulement  $1,37 \pm 0,34\%$  des myocytes ventriculaires collagène

$\alpha 1^{-}$  incorporaient BRDU (Figure 13). L'incorporation de BRDU dans une cellule indique qu'elle est en processus de synthèse d'ADN et donc qu'elle est active dans le cycle cellulaire. Bien qu'ils soient entrés dans le cycle cellulaire, il n'est pas possible de savoir si les cardiomyocytes incorporant BRDU vont entamer et achever la cytokinèse. Il est possible que ces derniers vont plutôt devenir binucléés et ainsi s'orienter vers un phénotype hypertrophique. C'est la dissociation de la cytokinèse et de la kariokinèse qui est responsable de la binucléation des cardiomyocytes, cette dissociation est nommée mitose acytokinétique. Étant donné le rôle prolifératif attribué à nestine, nous avons regardé si l'augmentation de nestine via la combinaison du SB203580 10uM avec le PDBu  $10^{-7}$ M était pour augmenter le pourcentage de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> actif dans la phase S du cycle cellulaire. L'augmentation de nestine dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux corrélait avec une entrée accrue des myocytes ventriculaires nestine<sup>(+)</sup> de rats néonataux dans la phase S du cycle cellulaire (cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> / BRDU<sup>(+)</sup>). Ce qui retenu notre attention était qu'il y avait présence d'une autre population cellulaire, des cardiomyocytes nestine<sup>(-)</sup> / BRDU<sup>(+)</sup>. Pour plusieurs raisons, il ne nous est pas possible de savoir exactement pourquoi les cardiomyocytes incorporant BRDU n'expriment pas tous nestine. Premièrement, peut-être que nestine est impliquée dans la prolifération cellulaire mais qu'elle n'est pas essentielle à celle-ci, et donc qu'il est normal de voir cette population cellulaire. Deuxièmement, peut-être que tous les cardiomyocytes incorporant BRDU expriment nestine, mais que son expression est passagère et au moment auquel les cellules ont été fixées, nestine n'y était plus exprimée. Troisièmement, l'incorporation de BRDU est uniquement un indice de synthèse d'ADN, il est possible que les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> / BRDU<sup>(+)</sup> vont finir le cycle cellulaire et se diviser alors que les cardiomyocytes nestine<sup>(-)</sup> / BRDU<sup>(+)</sup> vont plutôt s'orienter vers un phénotype hypertrophique (non prolifératif). Étant donné nos limites quant à l'interprétation de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de nestine dans les myocytes ventriculaires de rats néonataux corrélait avec leur réentrée dans le cycle cellulaire. Le cotraitement des cellules ventriculaires de rats néonataux avec le PDBu et le SB203580 a mené à une augmentation significative du pourcentage de myocytes ventriculaires collagène  $\alpha 1^{-}$  de rats néonataux incorporant BRDU (Figure 14). Un résultat analogue a été observé à la suite de la stimulation de 24h avec le FBS 10% lorsque combiné à l'action du SB203580 (Figure 15). L'augmentation de nestine à la suite du cotraitement avec PDBu et SB 203580 a donc corrélié avec l'augmentation du nombre de cardiomyocytes actifs dans la phase S du cycle cellulaire. Tel

que résumé aux figures 14 et 16, lorsque traité avec PDBu et SB203580, l'incorporation de BRDU suit le même patron dans nos cardiomyocytes marqués négativement par l'absence de collagène  $\alpha 1$  que par ceux marqués positivement par la présence de la forme cardiaque de la troponine T. Cette corrélation démontre que dans nos préparations de cardiomyocytes, les cellules nestine <sup>(+)</sup>/collagène <sup>(-)</sup> sont bel et bien majoritairement des cardiomyocytes. Il est possible qu'une faible population soit des cellules ressemblant à des cellules progénitrices cardiaques. Toutefois, ces dernières n'ont pas la même morphologie que les cardiomyocytes et expriment généralement nestine avec une plus forte intensité. Elles ont donc été écartées lors des analyses. Le même patron d'expression a été observé à la suite de la stimulation de 24 heures avec le FBS 10% seul ou en cotraitement avec le SB 203580 (Figure 15 et 17).

### **Limites de l'étude**

Une des faiblesses de notre étude est que le BRDU ne permet pas de savoir quelles cellules achèvent le cycle cellulaire et se divisent en deux cellules filles identiques. Le BRDU constitue uniquement un indice de synthèse d'ADN, il nous informe que les cellules sont dans la phase S de l'interphase mais on ne sait pas si les cellules vont passer à la phase G2 et ainsi de suite. D'autres techniques sont employées afin d'évaluer le pourcentage de cardiomyocytes néonataux en mitoses à la suite d'une inhibition de p38 via le SB203580. Le groupe du Dr Engel a regardé du côté de l'H3P (phosphorylated histone-3) (Engel et al., 2005). Cependant une fois encore, cette technique n'est pas parfaite, l'H3P permet uniquement de regarder la karyokinèse (la division nucléaire). Il y a division nucléaire chez les cardiomyocytes en train de se diviser de même que chez ceux effectuant une mitose acytokinétique, ces deux populations seront donc marquées par l'H3P. Toute comme avec le BRDU, l'H3P ne permet pas de distinguer les cardiomyocytes en prolifération versus ceux s'orientant vers un phénotype hypertrophique. Il est donc très important d'être minutieux lorsqu'on se réfère à la littérature afin de trouver des renseignements sur la prolifération des cardiomyocytes. Dans ce même papier, on peut lire dans le résumé que chez les souris transgéniques KO spécifiquement pour le p38 $\alpha$ , il y a une augmentation de 92,3%  $p < 0,01$  de la mitose des cardiomyocytes néonataux. Toutefois lorsqu'on se réfère au papier on voit premièrement que pour cette partie de l'étude, l'H3P a été utilisé pour évaluer l'augmentation de mitose dans ces cellules et deuxièmement, la phosphorylation de l'H3 est passée de 0,13%  $\pm$  0,05% à 0,25%  $\pm$  0,07%. Afin d'atteindre une différence significative

entre ces deux groupes qui sont à la limite du chevauchement, la taille de l'échantillon a du être énorme. Pourtant, plus loin dans ce même papier, la mitose est évaluée par immunofluorescence/microscopie confocale avec des anticorps anti-aurora B ou anti-survivine. Ces deux protéines se localisent dans l'anneau contractile lors de la cytokinèse. Ce marquage permet donc véritablement d'évaluer le nombre de cardiomyocytes proliférant. Ceci n'est qu'un des nombreux exemples qui nous indique que la prudence est de mise lorsqu'on se réfère aux études sur la prolifération des cardiomyocytes.

La polynucléation des cardiomyocytes ventriculaires survient durant les trois premières semaines de la vie. Durant cette période, ces cellules perdent leur capacité à effectuer la cytokinèse et donc à proliférer (Liu, Yue, Chen, Kubin, & Braun, 2010). La polyploïdie est une caractéristique de certaines cellules de mammifères qui très souvent sont différenciées terminalement et hautement spécialisées (Brodsky, 1991). Dans le système cardiovasculaire, la polyploïdie peut être induite par le stress et les blessures, ce qui suggère que la polynucléation sert à des fonctions spécifiques dans ces cellules. En fait, il a été démontré que la polyploïdie modifie la physiologie cellulaire et permet aux cellules de répondre à des besoins particuliers (Galitski, Saldanha, Styles, Lander, & Fink, 1999). La polynucléation peut être particulièrement utile pour les cardiomyocytes parce que règle général, ils sont incapables de prolifération et ont donc un éventail d'options limité lorsque vient le temps de répondre aux stress métaboliques et biophysiques (Rubart & Field, 2006). La génération de cardiomyocytes avec plusieurs noyaux peut être visualisée comme un moyen de contrôle cellulaire qui dissocie la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Durant ce processus, les cellules échappent à la mitose et procèdent à une ou plusieurs rondes de réplication de l'ADN, ce qui crée des cardiomyocytes polyploïdes qui ne se divisent plus (Liu et al., 2010). Nos résultats préliminaires démontrent que parmi les cardiomyocytes de rats néonataux nestine<sup>(+)</sup>, environ 90% était mononucléés lors du traitement SB203580 10uM avec le PDBu 10<sup>-7</sup>M. Cette sous-population de cardiomyocyte néonataux est donc possiblement encore capable de prolifération. Contrairement à leurs homologues binucléés qui se dirigent probablement vers une différenciation terminale et vers un phénotype hypertrophié.

L'immunofluorescence et la microscopie confocale constituent des techniques semis-quantitatives. Elles nous permettent de détecter la présence de protéines dans les cellules, et selon

l'intensité du signal, il est possible d'avoir une idée de la quantité de protéines présente. Toutefois, afin de doser de façon quantitative des protéines, il est préférable de s'en remettre à l'immunobuvardage de type western blot. L'idéal aurait été de doser nestine dans nos cardiomyocytes de rats néonataux à l'état basal puis en présence de la combinaison de SB203580 10uM et de PDBu  $10^{-7}$ M. Toutefois, étant donné que nos préparations sont constituées de 75 à 80 % de cardiomyocytes, les fibroblastes présents pourraient affecter le dosage. Puisque les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques de rats néonataux représentent deux populations cellulaires complètement différentes, on ne saurait pas à quel type cellulaire attribuer les variations de nestine.

Comme de fait, l'augmentation de l'incorporation de BRDU observé chez les cardiomyocytes de rats néonataux lorsque traité avec SB203580 10uM et PDBu  $10^{-7}$ M n'est pas présente chez les fibroblastes de la même préparation. Au contraire, tel qu'illustré à la Figure 20, les traitements d'une population pure de NNVF (neonatal ventricular fibroblast) avec PDBu seul ou en combinaison avec le SB203580 ont eu pour effet de diminuer l'incorporation de BRDU. Comme le démontre la Figure 21, la diminution de la synthèse d'ADN des NNVF a été confirmée par l'incorporation de la thymidine-H3 à la suite des mêmes traitements. Puisqu'il nous était impossible d'isoler une population pure de cardiomyocytes, ces expériences sur les NNVF nous ont permis de vérifier la fiabilité de notre protocole d'incorporation de BRDU. L'incorporation de la thymidine-H3 et l'incorporation de BRDU étant toutes deux des techniques permettant d'évaluer la synthèse d'ADN, des résultats différents via ces méthodes auraient été signe d'une problématique, mais ce ne fut pas le cas.

La prochaine étape était de vérifier l'efficacité des drogues que nous utilisons. Le PDBu est un composé pharmacologique qui active les voies PKC. Afin de vérifier sa spécificité, nous avons prétraité des NNVF avec le GF 109203X (GFX), un inhibiteur ATP-compétitif des PKC, puis ils ont été stimulés avec le PDBu  $10^{-7}$ M. Tel que le démontre la Figure 22, la baisse d'incorporation de thymidine-H3 induite par le PDBu a été renversée lorsque les NNVF ont été prétraités avec le GFX. Puisque la réponse induite par le PDBu a été renversée par un inhibiteur des PKC, nous en sommes venu à la conclusion que le PDBu activait bel et bien des voies PKC-dépendantes.

Afin de poursuivre mon étude, il serait important d'établir un modèle animal permettant l'inhibition des voies p38 et l'activation des voies PKC spécifiquement dans le tissu cardiaque. Ce modèle permettrait d'étudier l'impact in vivo de cette combinaison sur la taille de l'infarctus, la résistance de la cicatrice, la prolifération des cardiomyocytes ainsi que le taux de survie général des animaux à un infarctus.

## **Conclusion**



Nestine est une protéine filamenteuse intermédiaire de classe VI impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire. À l'âge adulte, elle est exclusivement retrouvée dans les cellules souches, les cellules progénitrices et les tissus en processus de régénération. Cette étude démontre qu'à la suite d'un infarctus du myocarde, l'origine des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> est une population endogène de cardiomyocyte ayant la possibilité de ré-exprimer nestine sous certaines conditions. De plus, cette étude a permis d'identifier nestine comme étant un nouveau marqueur permettant l'identification des cardiomyocytes de rats néonataux actifs dans la phase S du cycle cellulaire. Étant donné qu'une grande majorité des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> étaient mononuclés, il est possible que cette sous-population ait la possibilité d'achever le cycle cellulaire et ainsi de proliférer. Toutefois d'autres expériences seront nécessaires afin de déterminer si oui ou non l'augmentation de nestine est suffisante à l'aboutissement du cycle cellulaire chez les cardiomyocytes de rats néonataux. Un des moyens par lequel nestine est augmentée dans ces cellules est via la combinaison d'une stimulation des voies PKC dépendantes et d'une inhibition de la phosphorylation de p38. Par contre, cette combinaison n'a pas le même effet sur l'expression de nestine dans l'ensemble des cellules. À l'opposé des cardiomyocytes, l'administration de ce traitement à des fibroblastes cardiaques de rats néonataux mène à une diminution de l'expression de nestine. Ces résultats *in vitro* suggèrent fortement que la population de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> que l'on retrouve à la région infarctée/péri-infarctée est entrée dans le cycle cellulaire. Il reste encore à déterminer si les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur infarcté peuvent entrer dans les phases G2 et M du cycle cellulaire et former de nouveaux cardiomyocytes.

Les buts ultérieurs relatifs à cette étude seraient en premier lieu de déterminer *in vitro* si l'augmentation de nestine dans les cardiomyocytes de rats néonataux mène à une augmentation de leur prolifération. Par la suite, il faudrait évaluer notre capacité *in vivo* à augmenter nestine spécifiquement dans les cardiomyocytes et vérifier que cette augmentation a un effet prolifératif et qu'elle aide au rétablissement de la fonction cardiaque des animaux à la suite d'un infarctus du myocarde. De plus, nestine pourrait être utilisée autant dans la recherche fondamentale que clinique comme nouveau marqueur permettant l'évaluation de nouvelles drogues ayant un effet sur la prolifération des cardiomyocytes. Finalement, en dehors des

avancées dans le domaine de la régénération cardiaque pouvant découler de cette étude, il est possible que les mécanismes de régulation de nestine découverts dans cette étude soient conservés dans les cellules cancéreuses où on la retrouve et que son inhibition mène à une diminution du caractère malin de ces cancers.

## **Références**

- Ahuja, P., Sdek, P., & MacLellan, W. R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev*, *87*(2), 521-544. doi: 10.1152/physrev.00032.2006
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, *7*(4), 261-269.
- Anversa, P., Leri, A., Kajstura, J., & Nadal-Ginard, B. (2002). Myocyte growth and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*, *34*(2), 91-105. doi: 10.1006/jmcc.2001.1506
- Babinet, C. (2000). Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *J Am Soc Nephrol*, *11 Suppl 16*, S88-94.
- Bel Hadj, S. (2004). *Les protéines kinases C activées par les esters de phorbol modulent la croissance des cellules cardiaques*. (Thèse (M Sc ), Université de Montréal, Montréal). Accessible par CaQMU. (000484492)
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., & Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, *114*(6), 763-776.
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A., & Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, *344*(23), 1750-1757. doi: 10.1056/NEJM200106073442303
- Berry, S. E., Andruszkiewicz, P., Chun, J. L., & Hong, J. (2013). Nestin expression in end-stage disease in dystrophin-deficient heart: implications for regeneration from endogenous cardiac stem cells. *Stem Cells Transl Med*, *2*(11), 848-861. doi: 10.5966/sctm.2012-0174
- Bockamp, E., Sprengel, R., Eshkind, L., Lehmann, T., Braun, J. M., Emmrich, F., & Hengstler, J. G. (2008). Conditional transgenic mouse models: from the basics to genome-wide sets of knockouts and current studies of tissue regeneration. *Regen Med*, *3*(2), 217-235. doi: 10.2217/17460751.3.2.217
- Bornancin, F., & Parker, P. J. (1996). Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase Calpha. *Curr Biol*, *6*(9), 1114-1123.
- Brodsky. (1991). Cell ploidy in the mammalian heart (*The Development and Regenerative Potential of Cardiac Muscle*. London, UK: Harwood Academic Publishers.
- Bronson, S. K., & Smithies, O. (1994). Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J Biol Chem*, *269*(44), 27155-27158.
- Calderone, A. (2012). Nestin+ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *302*(1), H1-9. doi: 10.1152/ajpheart.00716.2011
- Camelliti, P., Borg, T. K., & Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, *65*(1), 40-51. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.020
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biologie*. (3e éd. éd.). St-Laurent, Qué.: ERPI.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, *244*(4910), 1288-1292.

- Chabot, A. (2011). *Le rôle de l'aldostérone sur le remodelage structurel pulmonaire et la fonction ventriculaire droite en insuffisance cardiaque congestive*. (Université de Montréal).
- Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2013). Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*, 1833(4), 945-953. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.023
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., & Toker, A. (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*, 8(19), 1069-1077.
- Claycomb, W. C., & Bradshaw, H. D., Jr. (1983). Acquisition of multiple nuclei and the activity of DNA polymerase alpha and reinitiation of DNA replication in terminally differentiated adult cardiac muscle cells in culture. *Dev Biol*, 99(2), 331-337.
- Clubb, F. J., Jr., & Bishop, S. P. (1984). Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest*, 50(5), 571-577.
- Dan, I., Watanabe, N. M., & Kusumi, A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol*, 11(5), 220-230.
- Denise Martin, E., De Nicola, G. F., & Marber, M. S. (2012). New therapeutic targets in cardiology: p38 alpha mitogen-activated protein kinase for ischemic heart disease. *Circulation*, 126(3), 357-368. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.071886
- Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L. H., Rollins, B. J., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*, 96(8), 881-889. doi: 10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a
- Dimmeler, S., Zeiher, A. M., & Schneider, M. D. (2005). Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*, 115(3), 572-583. doi: 10.1172/JCI24283
- Dutil, E. M., Toker, A., & Newton, A. C. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol*, 8(25), 1366-1375.
- Edwards, A. S., Faux, M. C., Scott, J. D., & Newton, A. C. (1999). Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of protein kinase C betaII. *J Biol Chem*, 274(10), 6461-6468.
- El-Helou, V., Chabot, A., Gosselin, H., Villeneuve, L., Clavet-Lanthier, M. E., Tanguay, J. F., Enikolopov, G., Fernandes, K. J., Jasmin, J. F., & Calderone, A. (2013). Cardiac resident nestin(+) cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol*, 228(9), 1844-1853. doi: 10.1002/jcp.24345
- Engel, F. B., Hsieh, P. C., Lee, R. T., & Keating, M. T. (2006). FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(42), 15546-15551. doi: 10.1073/pnas.0607382103
- Engel, F. B., Schebesta, M., Duong, M. T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J. B., Jiang, H., Wang, Y., & Keating, M. T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev*, 19(10), 1175-1187. doi: 10.1101/gad.1306705
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.

- Fisk, M., Gajendragadkar, P. R., Maki-Petaja, K. M., Wilkinson, I. B., & Cheriyan, J. (2014). Therapeutic Potential of p38 MAP Kinase Inhibition in the Management of Cardiovascular Disease. *Am J Cardiovasc Drugs*, 14(3), 155-165. doi: 10.1007/s40256-014-0063-6
- Frangogiannis, N. G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*, 58(2), 88-111. doi: 10.1016/j.phrs.2008.06.007
- Frangogiannis, N. G., Michael, L. H., & Entman, M. L. (2000). Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res*, 48(1), 89-100.
- Galitski, T., Saldanha, A. J., Styles, C. A., Lander, E. S., & Fink, G. R. (1999). Ploidy regulation of gene expression. *Science*, 285(5425), 251-254.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., & Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(12), 7380-7384.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. (12th<sup>e</sup> éd.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
- Health, N. I. o. (2002). Stem cell Basics. Repéré 2014
- Hommel, D. W., Peppelenbosch, M. P., & van Deventer, S. J. (2003). Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*, 52(1), 144-151.
- Johnson, J. E., Giorgione, J., & Newton, A. C. (2000). The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry*, 39(37), 11360-11369.
- Johnson, L. N., & O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol*, 6(6), 762-769.
- Kachinsky, A. M., Dominov, J. A., & Miller, J. B. (1995). Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem*, 43(8), 843-847.
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., & Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*, 5(12), 1394-1403.
- Koh, K. N., Kang, M. J., Frith-Terhune, A., Park, S. K., Kim, I., Lee, C. O., & Koh, G. Y. (1998). Persistent and heterogenous expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27KIP1, in rat hearts during development. *J Mol Cell Cardiol*, 30(3), 463-474. doi: 10.1006/jmcc.1997.0611
- Koivisto, E., Kaikkonen, L., Tokola, H., Pikkarainen, S., Aro, J., Pennanen, H., Karvonen, T., Rysa, J., Kerkela, R., & Ruskoaho, H. (2011). Distinct regulation of B-type natriuretic peptide transcription by p38 MAPK isoforms. *Mol Cell Endocrinol*, 338(1-2), 18-27. doi: 10.1016/j.mce.2011.02.015
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351 Pt 2, 289-305.
- Kumphune, S., Bassi, R., Jacquet, S., Sicard, P., Clark, J. E., Verma, S., Avkiran, M., O'Keefe, S. J., & Marber, M. S. (2010). A chemical genetic approach reveals that p38alpha MAPK activation by diphosphorylation aggravates myocardial infarction and is prevented by the direct binding of SB203580. *J Biol Chem*, 285(5), 2968-2975. doi: 10.1074/jbc.M109.079228

- Lazaro, J. B., Kitzmann, M., Poul, M. A., Vandromme, M., Lamb, N. J., & Fernandez, A. (1997). Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. *J Cell Sci*, *110* ( Pt 10), 1251-1260.
- Li, F., Wang, X., Bunger, P. C., & Gerdes, A. M. (1997). Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(6), 1541-1551. doi: 10.1006/jmcc.1997.0381
- Li, F., Wang, X., & Gerdes, A. M. (1997). Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *J Mol Cell Cardiol*, *29*(6), 1553-1565. doi: 10.1006/jmcc.1997.0403
- Liu, W., Zhang, Y., Liu, S., Liu, Q., Hao, J., Shi, Y., Zhao, S., & Duan, H. (2013). The expression of intermediate filament protein nestin and its association with cyclin-dependent kinase 5 in the glomeruli of rats with diabetic nephropathy. *Am J Med Sci*, *345*(6), 470-477. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3182648459
- Liu, Z., Yue, S., Chen, X., Kubin, T., & Braun, T. (2010). Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ Res*, *106*(9), 1498-1506. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211888
- Lu, S. Y., Sontag, D. P., Detillieux, K. A., & Cattini, P. A. (2008). FGF-16 is released from neonatal cardiac myocytes and alters growth-related signaling: a possible role in postnatal development. *Am J Physiol Cell Physiol*, *294*(5), C1242-1249. doi: 10.1152/ajpcell.00529.2007
- Ma, X. L., Kumar, S., Gao, F., Louden, C. S., Lopez, B. L., Christopher, T. A., Wang, C., Lee, J. C., Feuerstein, G. Z., & Yue, T. L. (1999). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, *99*(13), 1685-1691.
- Marieb, E. N. (2005). *Anatomie et physiologie humaines*. (3e éd. éd.). Saint-Laurent, Qué.: Éd. du Renouveau pédagogique.
- Martelli, A. M., Faenza, I., Billi, A. M., Fala, F., Cocco, L., & Manzoli, L. (2003). Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? *Histol Histopathol*, *18*(4), 1301-1312.
- Matz, D. G., Oberpriller, J. O., & Oberpriller, J. C. (1998). Comparison of mitosis in binucleated and mononucleated newt cardiac myocytes. *Anat Rec*, *251*(2), 245-255.
- Mignone, J. L., Kukekov, V., Chiang, A. S., Steindler, D., & Enikolopov, G. (2004). Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol*, *469*(3), 311-324. doi: 10.1002/cne.10964
- Nagy, A. (2003). *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*. (3rd éd.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, *204*(12), 3037-3047. doi: 10.1084/jem.20070885
- Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, *258*(5081), 424-429.
- Newton, A. C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *22*, 1-25. doi: 10.1146/annurev.bb.22.060193.000245

- Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, *101*(8), 2353-2364.
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., Entman, M. L., & Schneider, M. D. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(21), 12313-12318. doi: 10.1073/pnas.2132126100
- Orr, J. W., Keranen, L. M., & Newton, A. C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol Chem*, *267*(22), 15263-15266.
- Pallari, H. M., Lindqvist, J., Torvaldson, E., Ferraris, S. E., He, T., Sahlgren, C., & Eriksson, J. E. (2011). Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol Biol Cell*, *22*(9), 1539-1549. doi: 10.1091/mbc.E10-07-0568
- Poolman, R. A., Gilchrist, R., & Brooks, G. (1998). Cell cycle profiles and expressions of p21CIP1 AND P27KIP1 during myocyte development. *Int J Cardiol*, *67*(2), 133-142.
- Poss, K. D., Wilson, L. G., & Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science*, *298*(5601), 2188-2190. doi: 10.1126/science.1077857
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., & Anversa, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, *346*(1), 5-15. doi: 10.1056/NEJMoa012081
- Ren, G., Michael, L. H., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2002). Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem*, *50*(1), 71-79.
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, *68*(2), 320-344. doi: 10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004
- Rubart, M., & Field, L. J. (2006). Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol*, *68*, 29-49. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.124530
- Rulicke, T. (2004). Pronuclear microinjection of mouse zygotes. *Methods Mol Biol*, *254*, 165-194. doi: 10.1385/1-59259-741-6:165
- Rumyantsev, P. P. (1977). Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int Rev Cytol*, *51*, 186-273.
- Scobioala, S., Klocke, R., Kuhlmann, M., Tian, W., Hasib, L., Milting, H., Koenig, S., Stelljes, M., El-Banayasy, A., Tenderich, G., Michel, G., Breithardt, G., & Nikol, S. (2008). Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J*, *22*(4), 1021-1031. doi: 10.1096/fj.07-8252com
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, *79*(4), 551-555.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, *317*(6034), 230-234.
- Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., & Field, L. J. (1996). Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol*, *271*(5 Pt 2), H2183-2189.



- Souders, C. A., Bowers, S. L., & Baudino, T. A. (2009). Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*, *105*(12), 1164-1176. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209809
- Srivastava, A. K., Anand-Srivastava, M. B., & SpringerLink (Service en ligne) (2008). *Signal transduction in the cardiovascular system in health and disease*. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-09552-3> Accès réservé UdeM
- Subramaniam, A., Jones, W. K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., & Robbins, J. (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*, *266*(36), 24613-24620.
- Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., Howard, V. J., Rumsfeld, J., Manolio, T., Zheng, Z. J., Flegal, K., O'Donnell, C., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., Goff, D. C., Jr., Hong, Y., Adams, R., Friday, G., Furie, K., Gorelick, P., Kissela, B., Marler, J., Meigs, J., Roger, V., Sidney, S., Sorlie, P., Steinberger, J., Wasserthiel-Smoller, S., Wilson, M., Wolf, P., American Heart Association Statistics, C., & Stroke Statistics, S. (2006). Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, *113*(6), e85-151. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.171600
- Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Osumi, N., Okano, H., & Fukuda, K. (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol*, *170*(7), 1135-1146. doi: 10.1083/jcb.200504061
- Turner, N. A. (2011). *The Cardiac Fibroblast*. Research Signpost.
- Urbanek, K., Quaini, F., Tasca, G., Torella, D., Castaldo, C., Nadal-Ginard, B., Leri, A., Kajstura, J., Quaini, E., & Anversa, P. (2003). Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(18), 10440-10445. doi: 10.1073/pnas.1832855100
- Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C. A., Bussani, R., Beltrami, A. P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J., & Anversa, P. (2005). Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(24), 8692-8697. doi: 10.1073/pnas.0500169102
- von Harsdorf, R., Poole-Wilson, P. A., & Dietz, R. (2004). Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure. *Lancet*, *363*(9417), 1306-1313. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16006-6
- Walsh, K., & Perlman, H. (1997). Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, *7*(5), 597-602.
- Wang, J., & Nadal-Ginard, B. (1995). Regulation of cyclins and p34<sup>CDC2</sup> expression during terminal differentiation of C2C12 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, *206*(1), 82-88.
- Webb, B. L., Hirst, S. J., & Giembycz, M. A. (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol*, *130*(7), 1433-1452. doi: 10.1038/sj.bjp.0703452
- Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G., & Daemen, M. J. (1994). The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol*, *145*(4), 868-875.
- Zhao, Z., Lu, P., Zhang, H., Xu, H., Gao, N., Li, M., & Liu, C. (2014). Nestin positively regulates the Wnt/ss-catenin pathway and the proliferation, survival, and invasiveness of

breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res*, 16(4), 408. doi: 10.1186/s13058-014-0408-8

Zymek, P., Bujak, M., Chatila, K., Cieslak, A., Thakker, G., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2006). The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol*, 48(11), 2315-2323. doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.060