



Université de Montréal

**Les cellules endothéliales peuvent acquérir un phénotype  
mésenchymateux associé avec l'expression de la protéine  
nestine dans un modèle d'hypertrophie cardiaque et de  
fibrose réactive**

par

**Vanessa Hertig**

Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc en Physiologie Moléculaire, Cellulaire et  
Intégrative

Août, 2015

©, Vanessa Hertig, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Les cellules endothéliales peuvent acquérir un phénotype  
mésenchymateux associé avec l'expression de la protéine nestine dans  
un modèle d'hypertrophie cardiaque et de fibrose réactive**

Présentée par :

**Vanessa Hertig**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

---

**Philippe Comtois, PhD**

Président-rapporteur

---

**Angelo Calderone, PhD**

Directeur de recherche

---

**Daniel Bichet, MD, PhD**

Membre du jury

## RÉSUMÉ

L'hypertrophie cardiaque représente la réponse primaire du cœur dans le but d'améliorer la fonction cardiaque qui est compromise suite à un accident ischémique ou une surcharge hémodynamique. Cependant, l'hypertrophie cardiaque a pour conséquence pathologique la fibrose réactive, qui est caractérisée par la synthèse incontrôlée et le dépôt du collagène par les myofibroblastes. Ainsi, l'accumulation accrue du collagène dans le cœur hypertrophié mène à l'augmentation de la rigidité cardiaque et la détérioration progressive de la fonction contractile du cœur. Plusieurs études ont démontré que la protéine nestine, appartenant à la famille des filaments intermédiaires, est ré-exprimée dans les myofibroblastes durant la fibrose réparative et est impliquée dans la prolifération cellulaire. Basée sur ces observations, cette étude teste l'hypothèse selon laquelle nestine est induite dans les myofibroblastes suivant le développement de la fibrose réactive dans le cœur des rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale. Deux semaines suivant une constriction aortique supra-rénale chez le rat, un patron d'hypertrophie concentrique cardiaque a été observé et associé avec une réponse de fibrose réactive caractérisée par le dépôt accru de collagène dans le tissu interstitiel et la région péri-vasculaire de nombreux vaisseaux sanguins cardiaques. De plus, les niveaux de la protéine nestine sont augmentés significativement dans les cœurs des rats hypertrophiés, et ce, de façon corrélative avec la pression artérielle moyenne et la pression systolique du ventricule gauche. Les techniques d'immunofluorescences ont révélé une apparition accrue des cellules immunoréactives à nestine, qui présentent un phénotype mésenchymateux caractérisé par la co-expression de collagène dans le tissu interstitiel et la région péri-vasculaire des cœurs hypertrophiés. Ces données suggèrent que les fibroblastes résidents peuvent exprimer la protéine nestine ou que l'expression de nestine est induite en réponse aux facteurs profibrotiques impliqués dans la fibrose réactive. En effet, l'exposition des myofibroblastes normaux et des myofibroblastes isolés des cœurs hypertrophiés à l'Ang II, TGF- $\beta_1$  et EGF augmente significativement l'expression de la protéine nestine, tandis que l'expression de l' $\alpha$ -SMA demeure inchangée. De plus, de manière prédominante dans le cœur hypertrophié, des cellules non-vasculaires CD31<sup>(+)</sup> ont été détectées dans le tissu interstitiel et la région péri-vasculaire. Ces cellules co-expriment nestine et collagène suggérant une transition des cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux. Finalement, la protéine nestine, sous sa

forme filamenteuse, a été détectée dans les cellules endothéliales de l'artère coronaire humaine et leur exposition au TGF- $\beta_1$ , induit l'expression de collagène. En revanche, l'expression de collagène a été détectée dans les cellules microvasculaires de rats CD31<sup>(+)</sup>, alors que l'expression de nestine est absente. En réponse aux traitements de TGF- $\beta_1$  et EGF, l'expression de nestine, sous sa forme non-filamenteuse, est détectée dans les cellules microvasculaires de rats.

Collectivement, ces données supportent la prémisse selon laquelle la réponse de fibrose réactive dans les cœurs hypertrophiés, suite à une constriction aortique supra-rénale, est attribuée en partie à l'apparition des cellules mésenchymateuses positives à l'expression de nestine qui proviennent des fibroblastes résidents du ventricule. De plus, les données *in vivo* et *in vitro* suggèrent que les cellules endothéliales déplacées représentent une source additionnelle des cellules mésenchymateuses nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur hypertrophié et contribuent au développement de la fibrose réactive. Cibler la protéine nestine peut représenter une approche thérapeutique afin d'atténuer la réponse de fibrose réactive indépendamment de l'origine des cellules mésenchymateuses.

Mots-clés : hypertrophie cardiaque, fibrose réactive, nestine, cellules mésenchymateuses, cellules endothéliales

## ABSTRACT

Cardiac hypertrophy secondary to an ischemic insult or a hemodynamic overload represents the primary response of the heart to enhance compromised cardiac function. However, a pathological consequence of cardiac hypertrophy is reactive fibrosis characterized by the uncontrolled synthesis and deposition of collagen by proliferating myofibroblasts. Furthermore, the unrestrained accumulation of collagen in the hypertrophic heart leads to increased cardiac stiffness and progressive worsening of contractile function. Previous studies have reported that the intermediate filament protein nestin was re-expressed in myofibroblasts during reparative fibrosis and played a direct role in cell proliferation. Based on these observations, the following study tested the hypothesis that nestin was induced in myofibroblasts secondary to the development of reactive fibrosis in the heart of rats subjected to suprarenal aortic constriction. Two weeks following suprarenal aortic constriction of the adult male rat, a concentric pattern of cardiac hypertrophy was observed and associated with an overt reactive fibrotic response characterized by the increased deposition of collagen in the interstitium and perivascular region of numerous blood vessels. Nestin protein levels were significantly increased in the heart of hypertrophied rats and expression positively correlated with mean arterial pressure and left ventricular systolic pressure. Immunofluorescence approach revealed an increased appearance of nestin-immunoreactive cells in the interstitium and perivascular region of hypertrophied hearts and exhibited a mesenchymal phenotype characterized by collagen co-staining. The latter data suggests that resident fibroblasts may have expressed nestin and/or was induced in response to pro-fibrotic factors implicated in reactive fibrosis. Indeed, the exposure of normal myofibroblasts and myofibroblasts isolated from the hypertrophied heart to AII, TGF- $\beta$  and EGF significantly increased nestin protein levels, whereas  $\alpha$ -SMA expression remained unchanged. Moreover and predominantly in the hypertrophied heart, displaced non-vascular CD31<sup>(+)</sup> cells were detected in the interstitium and perivascular region that co-expressed nestin and collagen suggesting a transition of endothelial cells to a mesenchymal phenotype. Indeed, filamentous nestin was detected in human coronary artery endothelial cells and exposure to TGF- $\beta$  induced collagen expression. By contrast, collagen was detected in CD31<sup>(+)</sup> rat microvascular endothelial cells whereas nestin expression

was absent. In response to TGF- $\beta$  and EGF, nestin was expressed in rat microvascular endothelial cells but the reported filamentous phenotype was not observed.

Collectively, these data support the premise that the progression of the reactive fibrotic response in the hypertrophied heart secondary to suprarenal aortic constriction was attributed in part to the increased appearance of nestin<sup>(+)</sup> mesenchymal cells originating in part from resident ventricular myofibroblasts. Moreover, the *in vivo* and *in vitro* data further suggest that displaced endothelial cells may represent an additional source of nestin<sup>(+)</sup> mesenchymal cells in the hypertrophied heart contributing to the development of reactive fibrosis. Targeting nestin may represent a potential therapeutic approach to attenuate the reactive fibrotic response regardless the cellular origin of the mesenchymal cell.

Keywords: Cardiac hypertrophy, reactive fibrosis, nestin, mesenchymal cell, endothelial cells

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES</b> .....	<b>19</b>
1.1.1 Les facteurs de risques .....	19
<b>1.2 PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE</b> .....	<b>21</b>
1.2.1 La circulation coronarienne.....	22
1.2.2 Composition cellulaire du cœur .....	23
1.2.2.1 Les cardiomyocytes.....	24
1.2.2.2 Les fibroblastes cardiaques .....	24
1.2.2.2.1 Les marqueurs des fibroblastes cardiaques .....	26
1.2.2.3 Les myofibroblastes cardiaques .....	27
<b>1.3 HYPERTENSION ARTÉRIELLE</b> .....	<b>28</b>
1.3.1 Pression artérielle .....	28
1.3.2 Pression artérielle moyenne .....	28
1.3.3 L'hypertension artérielle .....	28
1.3.4 L'épidémiologie de l'hypertension artérielle .....	29
1.3.5 L'étiologie de l'hypertension artérielle .....	30
1.3.6 L'hypertension artérielle et les risques de maladies cardiovasculaires .....	30
1.3.7 Régulation physiologique de l'hypertension artérielle.....	30
1.3.8 Régulation de l'hypertension artérielle par le système rénine-angiotensine .....	31
1.3.8.1 L'action locale de l'angiotensine sur le cœur .....	32
1.3.9 Régulation mécanique cardiaque de l'hypertension artérielle.....	33
1.3.9.1 L'hypertrophie concentrique .....	33
<b>1.4 LA TRANSITION ENDOTHÉLIALE-MÉSENCHYMATEUSE (ENDMT)</b> .....	<b>37</b>
1.4.1 La transition inverse .....	38
1.4.2 Classification de l'EndMT .....	38
1.4.2.1 L'EndMT dans l'embryogénèse.....	39
1.4.2.2 L'EndMT et son implication dans les conditions fibrotiques.....	40
1.4.2.3 L'EndMT associé au cancer.....	41
1.4.3 L'EndMT et son implication dans la fibrose cardiaque .....	42
<b>1.5 LA PROTÉINE FILAMENTEUSE NESTINE</b> .....	<b>44</b>
1.5.1 L'expression de la protéine nestine dans le corps .....	44
1.5.2 L'expression de la protéine nestine dans le cœur.....	45
1.5.3 Le rôle de la protéine nestine dans les fibroblastes .....	46
1.5.4 Le rôle de la protéine nestine dans l'EMT .....	47
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>49</b>



<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>50</b>
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS .....</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>118</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DE L'HYPERTENSION EN FONCTION DE LA PRESSION SYSTOLIQUE ET DIASTOLIQUE SELON LE 6 <sup>E</sup> RAPPORT DU COMITÉ NATIONAL SUR LA PRÉVENTION, LA DÉTECTION, L'ÉVALUATION ET LE TRAITEMENT DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE.....	29
---	----

## CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

TABLEAU 2.1 : ANTICORPS UTILISÉS POUR LES PROCÉDÉS D'IMMUNOFLUORESCENCE.....	57
TABLEAU 2.2 : ANTICORPS UTILISÉS POUR LES IMMUNOBUVARDAGES DE TYPE WESTERN BLOT .....	58

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

TABLEAU 3.1 : VALEURS HÉMODYNAMIQUES DES RATS SHAM ET DES RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES .....	65
TABLEAU 3.2: POIDS DES RATS SHAM ET DES RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES .....	65

# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

FIGURE 1.1 : CIRCULATION PULMONAIRE ET CIRCULATION SYSTEMIQUE.....	22
FIGURE 1.2 : LE ROLE DES FIBROBLASTES .....	26
FIGURE 1.3 : LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE .....	32
FIGURE 1.4 : L'HYPERTROPHIE CONCENTRIQUE .....	35
FIGURE 1.5 : LA TRANSITION ENDOTHELIALE-MESENCHYMATEUSE (ENDMT) .....	38
FIGURE 1.6 : L'ORIGINE DES FIBROBLASTES ACTIVES LORS DE CONDITIONS FIBROTIQUES .....	41

## CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

FIGURE 3.1 : LA CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) MÈNE À L'HYPERTROPHIE DU VENTRICULE GAUCHE APRÈS DEUX SEMAINES CHEZ LE RAT. ....	66
FIGURE 3.2 : LA CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES PROVOQUE UN ÉPAISSISSEMENT DU VENTRICULE GAUCHE .....	67
FIGURE 3.3 : LA CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES PROVOQUE UNE FIBROSE RÉACTIVE DANS LA RÉGION INTERSTITIELLE DU VENTRICULE GAUCHE CHEZ LE RAT .....	68
FIGURE 3.4 : LA CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES PROVOQUE LA FIBROSE RÉACTIVE DANS LA RÉGION PÉRI-VASCULAIRE APRÈS DEUX SEMAINES CHEZ LE RAT .....	69
FIGURE 3.5 : L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE EST AUGMENTÉE DANS LES CŒURS DE RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES ....	71
FIGURE 3.6 : CORRÉLATION DE L'EXPRESSION NESTINE AVEC LA PRESSION SYSTOLIQUE ARTÉRIELLE ET LA PRESSION DIASTOLIQUE ARTÉRIELLE .....	72

FIGURE 3.7 : CORRÉLATION DE L'EXPRESSION NESTINE AVEC LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE .....	73
FIGURE 3.8 : CORRÉLATION DE L'EXPRESSION NESTINE AVEC LA PRESSION SYSTOLIQUE DANS LE VENTRICULE GAUCHE.....	74
FIGURE 3.9 : PRÉSENCE DE CARDIOMYOCYTES NESTINE <sup>(+)</sup> DANS LES CŒURS DE RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES.....	77
FIGURE 3.10 : PRÉSENCE DE CELLULES MÉSENCHYMATEUSES NESTINE <sup>(+)</sup> DANS LES CŒURS DE RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES .....	78
FIGURE 3.11 : PRÉSENCE DE CELLULES MÉSENCHYMATEUSES NESTINE <sup>(+)</sup> DANS LES CŒURS DE RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES .....	80
FIGURE 3.12 : AUGMENTATION DES CELLULES CO-EXPRIMANT NESTINE ET CD31 DANS LES CŒURS DE RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES.....	81
FIGURE 3.13 : AUGMENTATION DES CELLULES CO-EXPRIMANT NESTINE ET CD31 DANS LES CŒURS DE RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES.....	82
FIGURE 3.14 : ABSENCE DE LA PROTÉINE NESTINE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES.....	84
FIGURE 3.15 : L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE EST AUGMENTÉE DANS LES FIBROBLASTES NORMAUX EXPOSÉS AUX FACTEURS PRO-FIBROTIQUES .....	86
FIGURE 3.16 : L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE EST AUGMENTÉE DANS LES FIBROBLASTES ISOLÉS DES CŒURS DE RATS, AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRA-RÉNALE (CAS), EXPOSÉS AUX FACTEURS PRO-FIBROTIQUES .....	87
FIGURE 3.17 : L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE EST AUGMENTÉE DANS LES FIBROBLASTES NORMAUX EXPOSÉS AUX FACTEURS PRO-FIBROTIQUES .....	88
FIGURE 3.18 : LES MYOFIBROBLASTES RÉCAPITULENT UN PHÉNOTYPE ENDOTHÉLIAL SUR MATRIGEL .....	90

FIGURE 3.19 : AUGMENTATION DES CELLULES QUI CO-EXPRIMENT COLLAGÈNE A <sub>1</sub> , CD31 ET NESTINE DANS LES CŒURS DES RATS AYANT SUBI UNE CONSTRICTION AORTIQUE SUPRARÉNALE (CAS) DE DEUX SEMAINES.....	94
FIGURE 3.20 : VARIATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES DES VAISSEAUX DU CŒUR.....	95
FIGURE 3.21 : L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE EST AUGMENTÉE DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES DE RATS EXPOSÉES AUX FACTEURS PRO-FIBROTIQUE .....	98
FIGURE 3.22 : L'EXPRESSION DE LA MOLÉCULE D'ADHÉSION CELLULAIRE ENDOTHÉLIALE PLAQUETTAIRE (eNOS) EST DIMINUÉE DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES DE RATS SUIVANT UNE STIMULATION DE 48 HEURES AU TGF-B <sub>1</sub> .....	99
FIGURE 3.23 : L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE NESTINE EST AUGMENTÉE DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES DE RATS SUIVANT UNE STIMULATION DE 48 HEURES AU TGF-B <sub>1</sub> .....	100
FIGURE 3.24 : L'EXPRESSION DE COLLAGÈNE A <sub>1</sub> EST AUGMENTÉE DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES D'ARTÈRES CORONAIRES HUMAINES SUIVANT UNE STIMULATION DE 72 HEURES AU TGF-B <sub>1</sub> .....	101
FIGURE 3.25 : L'EXPRESSION DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE ENDOTHÉLIALE (eNOS) DEMEURE INCHANGÉE DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES D'ARTÈRES CORONAIRES HUMAINES SUIVANT UNE STIMULATION DE 72 HEURES AU TGF-B <sub>1</sub> .....	102

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

+dP/dT	Dérivée première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (Vitesse de contraction du cœur)
-dP/dT	Dérivée première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (Vitesse de relaxation du cœur)
$\alpha$	Alpha
$\alpha$ -SMA	Alpha actine du muscle lisse
AI	Angiotensine I
AII	Angiotensine II
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AT	Récepteur à l'angiotensine
AV	Auriculo-ventriculaire
AVC	Accident cérébral vasculaire
CAS	Constriction aortique supra-rénale
CD31	Molécule d'adhésion cellulaire endothéliale plaquettaire
CD90	Antigène sur la surface cellulaire Thy-1
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4' 6'-diamidino-2-phenylindole
DDR2	Domaine du récepteur de la discoïdine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL	Enhanced ChemiLuminescent,
ECM	Matrice extracellulaire
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Transition épithéliale-mésenchymateuse
EndMT	Transition endothéliale-mésenchymateuse
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale

EP	Épaisseur de la paroi
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Sérum bovin fœtal
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FSP1	Protéine 1 spécifique aux fibroblastes
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPS	Hématoxyline Phloxine Safran
JNC	Le comité national mixte sur la prévention, la détection, l'évaluation et le traitement de l'hypertension
LEF-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MAP	Pression artérielle moyenne
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MET	Transition mésenchymateuse-épithéliale
MMP	Métalloprotéinases matricielles
n	Nombre de rats
NDS	Sérum normal d'âne
NGS	Sérum normal de chèvre
O <sub>2</sub>	Oxygène
O.C.T	Optimal cutting temperature
P	Pression du ventricule gauche
PAD	Pression artérielle diastolique
PAM	Pression artérielle moyenne
PAS	Pression artérielle systolique
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Poids du cœur de rat
PDAC	Adénocarcinome canalaire du pancréas
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PP	Pression sur la paroi

PR	Poids du rat
PSVD	Pression systolique du ventricule droit
PSVG	Pression systolique du ventricule gauche
R	Rayon de la cavité
RAS	Système rénine-angiotensine
SIP-1	Smad interacting protein 1
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant bêta
THY1	Molécule d'adhésion cellulaire
TIMPs	Inhibiteurs endogènes spécifiques des métalloprotéinases matricielles
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche
ZEB-1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1



## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Comtois et le Dr. Bichet d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire. Je suis reconnaissante du temps que vous m'accordez et de vos précieux conseils.

J'aimerais ensuite démontrer ma gratitude à Angelo Calderone, qui m'a accueillie dans son laboratoire malgré mon parcours inhabituel et mon titre d'anthropologue. Angelo, tu m'as offert une opportunité incroyable et je t'en serai toujours grandement reconnaissante. Merci de m'avoir offert ton amitié, ton soutien, ta patience et ton enseignement. Ces dernières années ont été riches en émotions et je suis privilégiée de les avoir passés en ta compagnie. Je tiens à te remercier d'avoir partagé ta passion avec moi.

Je tiens à remercier Joanne Payette pour son travail exceptionnel et son soutien lors de mon cheminement. Merci Joanne d'être à l'affût de ce que nous oublions et de répondre à tout instant à nos questions.

Mes remerciements vont ensuite à mes collègues qui ont contribué à ma réussite. J'aimerais remercier Xavier Levac, avec qui j'ai eu la chance de développer une véritable amitié. Ta rigueur scientifique, tes conseils et ton habileté à vulgariser la science m'ont permis de m'améliorer en tant que scientifique. Je tiens à te remercier d'avoir pris le temps de m'expliquer, d'avoir partagé ton intérêt et d'avoir résolu tous mes problèmes techniques. Tu as été un pilier indispensable à ma réussite. Merci pour toutes ces soirées inoubliables et merci de partager ta motivation. J'aimerais remercier Andréanne Chabot d'avoir investi beaucoup de temps dans ma formation. Tu as été présente tout le long de ma maîtrise et tu as toujours été disponible afin de répondre à mes questions. Ta bonne humeur quotidienne me manquera. J'aimerais remercier Kim Tardif de m'avoir prise sous son aile et de m'avoir inculquée ses connaissances. Ton enseignement a été plus que précieux pour moi. Merci de m'avoir offert ta patience et transmis tes qualités de scientifique. J'aimerais également remercier Marc-André Méus qui a été un complice hors-pair. Finalement, j'aimerais remercier Natacha Duquette et Louis Villeneuve, sans qui ce travail n'aurait pu être accompli. Merci Nat pour ce temps considérable passé dans la salle de chirurgie. Merci Louis d'avoir écouté tous mes états d'âmes et de m'avoir offert ton soutien.

J'aimerais remercier mes très chères amies et colocataires, Sara-Jeanne, Corinne et Valérie. Merci d'avoir rendu ces deux dernières années possibles grâce à votre écoute, votre soutien et votre présence. Merci de m'avoir laissée pratiquer mes présentations devant vous. Merci de m'avoir laissée la table de cuisine pendant un mois afin que j'aie un bureau. Un merci spécial à Sara-Jeanne d'avoir dessiné toutes mes illustrations et d'avoir démontré un intérêt envers les fibroblastes. Je tiens à remercier Val et Lilah pour avoir lu et relu mon mémoire. Merci pour vos corrections et votre attention.

J'aimerais remercier mes parents et ma sœur, Suzanne, Sylvain, Michel et Mélissa. Merci d'avoir compris ce qu'impliquaient les études aux cycles supérieurs. Merci de m'avoir écoutée, encouragée, supportée et aimée. Vos conseils m'ont permis de devenir la femme que je suis devenue.

J'aimerais également remercier ma tante Josée et son conjoint Guy. Merci d'avoir agrémente mes soirées d'étudiantes. Merci de me servir de modèles à bien des égards. Nos longues discussions représentent pour moi une source infinie de motivations.

J'aimerais également remercier l'équipe de Deuxième Peau. Merci Zoé et Théodore de m'avoir encouragée dans mes études de m'avoir offert la possibilité de m'épanouir. Merci à Émilie, Val, Hélène, Kath et Lilah, de m'avoir écoutée parler de science. Merci de m'avoir offert une formation qu'on ne peut pas apprendre à l'école.

Finalement, j'aimerais remercier Patrick pour son soutien et son écoute. Merci d'être présent à mes côtés et de rendre chaque jour merveilleux. Merci pour tes précieux conseils et ta présence. Merci d'être la personne que tu es et de la partager avec moi.

## **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## **1.1 Les maladies cardiovasculaires**

Les maladies cardiovasculaires se trouvent parmi les principales causes de mortalité au niveau planétaire et les projections pour les années à venir n'en demeurent pas moins inquiétantes. Au Canada, en 2011, les maladies du cœur se situaient au 2<sup>e</sup> rang de l'échelle des décès et représentaient la source première des hospitalisations touchant environ 50 000 canadiens (1). En plus des décès qu'elles encourent, les cardiopathies imputent des frais de services médicaux de plus de 20 milliards de dollars, soit 10% des dépenses budgétaires du gouvernement canadien (2). La recherche dans le domaine cardiovasculaire et la prévention des maladies cardiaques sont donc des actions prioritaires pour pallier aux problèmes de santé publique et aux problèmes économiques du Canada.

Les maladies cardiovasculaires regroupent différentes conditions qui affectent le fonctionnement physiologique du cœur. Dans ce groupe de pathologies, on retrouve des problèmes tels que l'angine, l'arythmie, l'insuffisance cardiaque, les maladies coronariennes, les troubles valvulaires, l'infarctus du myocarde et l'hypertrophie cardiaque secondaire à l'hypertension artérielle (3).

### **1.1.1 Les facteurs de risques**

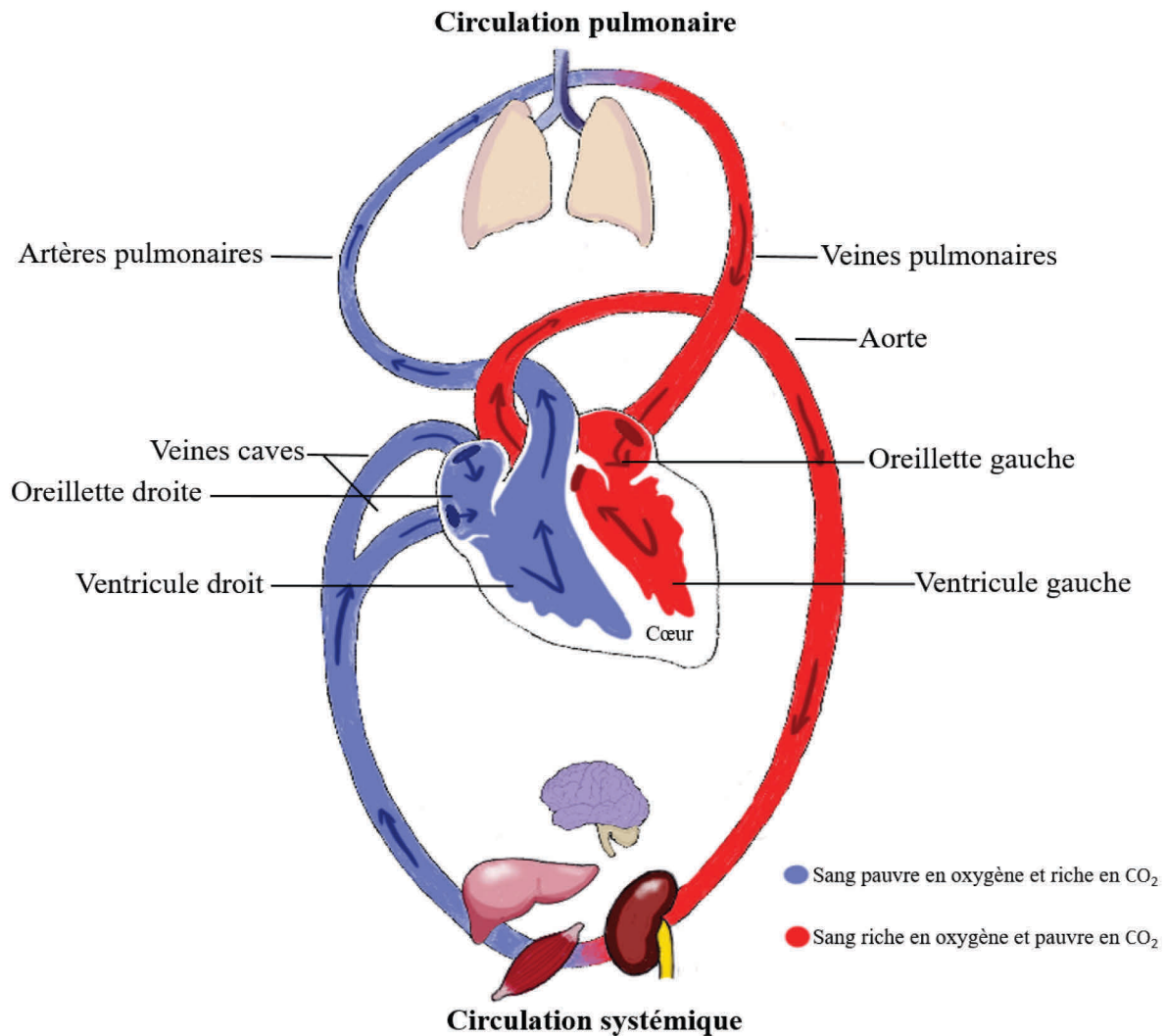
Dans le but d'améliorer les pronostics des patients, plusieurs fondations dans le domaine de la santé ont choisi de sensibiliser la population aux différents risques à l'origine des maladies cardiovasculaires. En effet, selon la Fondation des Maladies du Cœur et de l'AVC, il est prédit que 90% de la population canadienne est à risque de souffrir d'une maladie cardiovasculaire (4). Les accidents cardiovasculaires peuvent être prévenus par des habitudes de vie saines, mais certains facteurs relèvent plutôt de la génétique, ce qui les rend impossibles à contrôler (4).

Parmi les facteurs contrôlables, on retrouve la consommation d'alcool, le tabagisme, l'embonpoint, la sédentarité, le stress et l'hypertension artérielle (4). L'hypertension artérielle est un facteur de risque important quant au développement des maladies cardiovasculaires, qui peut toutefois être contrôlé par des habitudes de vies saines. Par contre, plusieurs variables qui

échappent à notre volonté, telles que l'âge, le sexe et l'origine ethnique peuvent en contrepartie affecter le maintien de la pression artérielle (5). Il est recommandé de réduire ses consommations d'alcool, de ne pas fumer de tabac et de limiter les sources quotidiennes de stress. On suggère également de maintenir un poids santé en s'alimentant de façon saine et en effectuant un exercice quotidien d'environ 30 minutes. Bien que les liens entre le stress et notre santé cardiovasculaire paraissent moins évidents, il semblerait que cela puisse être la source d'un mauvais taux de cholestérol et d'une augmentation de pression artérielle (6–8).

## 1.2 Physiologie cardiovasculaire

Le cœur est un organe pulsatile dont la fonction est de coordonner les mouvements de ses chambres afin de distribuer le sang vers les organes périphériques via la circulation systémique ou pulmonaire (9, 10). On distingue dans le cœur quatre différentes chambres, soit deux ventricules et deux oreillettes par lesquelles la circulation sanguine s'effectue. Le rôle des oreillettes consiste à recevoir le sang afin de le redistribuer vers les cavités des ventricules alors que le rôle des ventricules est de fournir la force nécessaire pour propulser le sang vers les organes (9, 10). Le circuit sanguin peut être décrit en quelques étapes linéaires. Le sang veineux de la circulation systémique revient dans l'oreillette droite par les veines caves inférieures et supérieures, pour être ensuite distribué vers le ventricule droit. Le sang est pompé par le ventricule droit vers la circulation pulmonaire afin d'être oxygéné. Ensuite, le sang oxygéné retourne dans l'oreillette gauche par les veines pulmonaires et il est redirigé vers le ventricule gauche. Une fois dans le ventricule gauche, le sang est pompé vers l'aorte pour rejoindre la circulation sanguine systémique (10) (figure 1.1).



**Figure 1.1 : Circulation pulmonaire et circulation systémique**

### 1.2.1 La circulation coronarienne

À la base de l'aorte se trouve le sinus de Valsalva, où prennent naissance les artères coronaires. On retrouve l'ostium de l'artère coronaire droite sur la face antérieure du sinus, alors que l'ostium de l'artère coronaire gauche est situé sur la face gauche postérieure du sinus. L'artère coronaire droite dévie vers la droite afin d'atteindre la rainure auriculo-ventriculaire (AV), où elle se divise pour former deux ramifications, soit le rameau marginal droit, qui irrigue

le myocarde du ventricule droit et le rameau interventriculaire postérieur, qui irrigue les faces postérieures des deux ventricules. L'artère coronaire gauche dévie vers la gauche, se prolonge et se divise afin de former le rameau interventriculaire antérieur dans le sillon interventriculaire antérieur, qui irrigue le septum interventriculaire et les faces antérieures des ventricules. La deuxième ramification de l'artère coronaire droite est le rameau circonflexe qui irrigue l'oreillette gauche et la paroi postérieure du ventricule gauche. Le sang des artères coronaires, qui sont situées sur l'épicarde du cœur, pénètre le myocarde via des branches musculaires qui traversent les murs des ventricules. Une source minimale d'apport sanguin provient des cavités cardiaques via les vaisseaux artério-sinusoïdaux et artério-luminaux (10, 11).

Le sang veineux provenant du ventricule gauche se déverse dans le sinus coronaire, qui est parallèle au rameau circonflexe de l'artère coronaire gauche, sur la face antérieure du cœur et s'écoule ensuite dans l'oreillette droite. Une fraction du sang veineux du ventricule gauche et le sang veineux provenant du ventricule droit se déversent dans l'oreillette droite via les veines antérieures cardiaques (10, 11).

### **1.2.2 Composition cellulaire du cœur**

Le cœur est composé majoritairement de cardiomyocytes et de fibroblastes. Dans une moindre proportion, on y retrouve les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, ainsi que les différentes niches de cellules souches. Chez le rat, les myocytes représentent environ 80% du volume cardiaque et 25% des cellules totales, alors que les cellules non-myocytaires représentent environ 20% du volume cardiaque et 75% des cellules totales (12). Les cellules non-myocytaires sont composées d'une majorité de fibroblastes cardiaques qui représentent un total de 95% des cellules (12). La composition cellulaire du cœur est sujette à changement selon l'espèce. Par contre, la composition du cœur en terme de cellules est conservée chez l'humain et chez le rat, ce qui nous permet d'utiliser le rat comme modèle animal afin d'étudier différentes pathologies présentes chez l'humain (12).



### **1.2.2.1 Les cardiomyocytes**

Le muscle cardiaque est composé de nombreux cardiomyocytes ayant généralement une configuration cylindrique formant une structure de treillis. Les cardiomyocytes sont les cellules responsables de la contraction cardiaque. Ils sont composés majoritairement de myofibrilles dans lesquels on retrouve les unités contractiles du cœur, soit les sarcomères (9, 10).

Chez l'humain au stade adulte, un cardiomyocyte mesure environ 100  $\mu\text{m}$  de longueur et entre 20  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$  de largeur et de profondeur. La morphologie des cardiomyocytes peut être sujette à des changements lors de conditions pathologiques. Par exemple, l'hypertrophie secondaire à l'hypertension artérielle provoque un agrandissement des cardiomyocytes au niveau de la largeur et au niveau de la longueur pour compenser la surcharge effectuée sur le cœur (13).

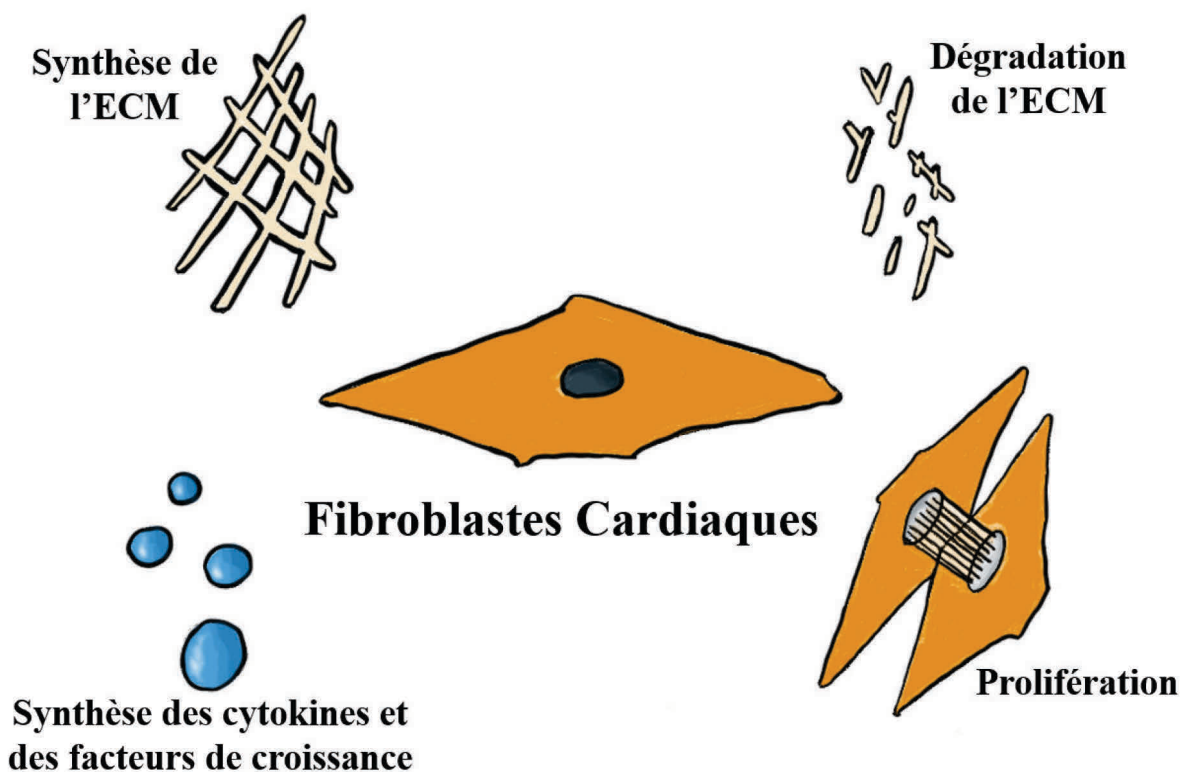
### **1.2.2.2 Les fibroblastes cardiaques**

Les fibroblastes cardiaques sont les cellules les plus abondantes dans le cœur en terme quantitatif et on les retrouve sous forme de réseau, intercalés de façon hétérogène entre les cardiomyocytes dans la structure globale de cet organe (14). Les fibroblastes cardiaques sont caractérisés par leur forme étoilée et de multiples extensions (15). Ces cellules sont reconnues pour jouer un rôle structurel dans le cœur et agissent à titre d'échafaudage pour les autres cellules. Lors du développement du cœur, la prolifération des fibroblastes permet l'augmentation de la fraction de collagène dans le cœur et favorise la formation du cytosquelette cardiaque et des différentes structures cardiaques (16).

Les rôles principaux des fibroblastes adultes s'inscrivent dans la synthèse, la dégradation, le remodelage et le maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire (ECM), qui est composée de collagène, de laminine, de glycoprotéines et des protéoglycans (17, 18) (figure 1.2). De ce fait, l'homéostasie de l'ECM est caractérisée par des cycles de synthèse et de dégradation qui sont régulés par les fibroblastes cardiaques (19). La synthèse du collagène par les fibroblastes est initiée par le facteur de croissance transformant (TGF-  $\beta$ ), alors que le

collagène qui compose l'ECM est d'abord synthétisé sous une forme précurseur à l'intérieur du fibroblaste, puis exporté à l'extérieur de la cellule où il est modifié pour devenir mature. La forme mature du collagène possède une demi-vie d'environ 100 jours en conditions physiologiques (20). La dégradation du collagène s'effectue par les métalloprotéinases matricielles (MMP) et les inhibiteurs endogènes spécifiques des métalloprotéinases matricielles (TIMPs), qui sont régulés par différentes cytokines sécrétées, entre autres par les fibroblastes cardiaques (21).

Les fibroblastes s'adaptent de façon dynamique face aux différentes cytokines et facteurs de croissance. En réponse aux cytokines inflammatoires et aux facteurs fibrotiques, les fibroblastes libèrent ces mêmes cytokines et facteurs afin d'amplifier le signal initial. En outre, de manière spécifique au contexte, une seconde réponse des fibroblastes est d'accélérer la production et la dégradation de l'ECM (22). Par conséquent, les fibroblastes cardiaques jouent un rôle important dans le remodelage de l'ECM, ce qui leur confère un rôle primordial dans les pathologies impliquant un remodelage cardiaque, telles que l'infarctus du myocarde, l'hypertrophie et la défaillance cardiaque. La synthèse excessive de l'ECM dans des conditions de remodelage, aussi nommée d'après le terme fibrose, peut être qualifiée de réparative ou de réactive. Suite à un infarctus du myocarde, la formation de la cicatrice par l'excrétion des composantes de l'ECM prévient la perte de cardiomyocytes et la rupture cardiaque, puis procure un support structurel au cœur. En revanche, l'hypertension artérielle provoque une sécrétion excessive du collagène par les fibroblastes, qui est considérée comme étant une fibrose réactive, puisqu'elle provoque une augmentation de la rigidité du muscle cardiaque et provoque une dysfonction cardiaque (18).



**Figure 1.2 : Le rôle des fibroblastes**

### 1.2.2.2.1 Les marqueurs des fibroblastes cardiaques

Une des plus grandes difficultés dans l'étude des fibroblastes est l'absence de marqueurs spécifiques à ce type cellulaire (18, 23). La plupart des protéines utilisées afin d'identifier les fibroblastes cardiaques sont présentes dans d'autres types cellulaires, tels que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses, ce qui rend les études *in vivo* laborieuses. Dans la littérature scientifique, un des marqueurs les plus utilisés est le marqueur de la protéine 1 spécifique aux fibroblastes (FSP1). La FSP1 est reconnue comme étant un marqueur des fibroblastes dans plusieurs organes (24). Toutefois, il a été démontré que FSP1 n'identifiait qu'une minime population des fibroblastes. Lors de pathologies cardiaques, le marqueur FSP1 est visible, entre autres dans une population de leucocytes, de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses (25, 26). Le marqueur vimentine est aussi largement utilisé pour identifier les

fibroblastes cardiaques. Par contre, ce filament intermédiaire est aussi présent dans les cellules endothéliales (27). La protéine de surface Thy-1 (CD90), utilisée pour identifier les fibroblastes cardiaques, est un récepteur que l'on retrouve également au niveau de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques cardiaques (28). Le récepteur tyrosine kinase qui lie le collagène (DDR2, récepteur du domaine de la discoïdine) identifie les fibroblastes cardiaques et les cellules dérivées de la moelle osseuse, soit les fibrocytes (18). Récemment, les anticorps contre les composantes de l'ECM ont été employés afin de palier à l'aspect générique des marqueurs communs. Le collagène  $\alpha_1$ , qui est synthétisé par les fibroblastes, s'est avéré être un marqueur d'appoint pour identifier les fibroblastes en conditions physiologiques et pathologiques (29).

### **1.2.2.3 Les myofibroblastes cardiaques**

Les myofibroblastes sont décrits comme étant des fibroblastes qui acquièrent un phénotype spécialisé et actif. Les myofibroblastes se distinguent des fibroblastes par leur expression de l'alpha actine du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA), leur phénotype contractile, leur synthèse accrue des composantes de l'ECM et leur synthèse des facteurs inhibant la dégradation de l'ECM (30). Ces cellules jouent un rôle important dans différents processus de remodelage cardiaque physiologiques et pathologiques, tels que l'infarctus du myocarde et l'hypertension artérielle (31). Les avantages liés au phénotype actif des myofibroblastes leur permettent d'optimiser la formation de la cicatrice, aussi connue sous le nom de fibrose réparative, suivant l'infarctus du myocarde. Les myofibroblastes sont aussi impliqués dans le dépôt excessif du collagène dans la zone interstitielle et péri-vasculaire que l'on retrouve dans le cœur hypertendu (32). La nécrose des cardiomyocytes et le relâchement de facteurs de croissance, tels que le TGF-  $\beta_1$  par les cellules inflammatoires dans le cœur infarci ou hypertendu, sont des stimuli impliqués dans le changement de phénotype des fibroblastes vers un phénotype de myofibroblastes (33).

## **1.3 Hypertension artérielle**

### **1.3.1 Pression artérielle**

Le cœur est un organe pulsatile qui expulse le sang vers la circulation systémique en imposant une variation de la pression dans les vaisseaux sanguins (9). La pression artérielle représente la force exercée par le sang sur les parois des vaisseaux sanguins et est définie comme étant le produit du débit sanguin par les résistances périphériques (9). On distingue la plus haute pression mesurée comme étant la pression artérielle systolique, soit de 120 mm Hg, et la plus basse pression mesurée comme étant la pression diastolique, soit de 80 mm Hg. La pression systolique survient lorsque le cœur est en contraction et la pression diastolique se manifeste lorsque que le cœur est en relaxation (9).

### **1.3.2 Pression artérielle moyenne**

La pression artérielle est la pression à laquelle le sang est propulsé dans le réseau sanguin systémique et la pression artérielle moyenne représente la pression moyenne observée pendant le cycle cardiaque. La pression artérielle moyenne est évaluée à 96 mm Hg et diffère légèrement de la moyenne de la pression systolique et de la pression diastolique, puisque la diastole couvre une période légèrement plus longue dans le cycle pulsatile (9, 10).

### **1.3.3 L'hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle se traduit par une haute pression sanguine et peut être quantifiée avec la mesure de la pression artérielle. Ainsi, chez un adulte, une pression artérielle au-dessus de la pression artérielle moyenne de 140/90 mm Hg est un indicatif de l'hypertension artérielle (34). L'augmentation de la pression artérielle est directement liée aux pathologies structurelles et fonctionnelles du cœur. Une classification des stages de l'hypertension a été établie, puisqu'il s'agit d'un syndrome cardiovasculaire progressif (34). Le comité national mixte sur la prévention, la détection, l'évaluation et le traitement de l'hypertension (JNC) distingue dans son dernier rapport la pression artérielle normale qui se situe en-dessous de

120/80 mm Hg, la pression artérielle élevée qui se situe entre 120-139/80-89 mm Hg, le stage 1 d'hypertension qui se situe entre 140-159/90-99 mm Hg et le stage 2 d'hypertension qui se situe au-dessus de 160/100 mm Hg (tableau 1) (34). La nouvelle classification du JNC a pour objectif de cibler l'efficacité des traitements, de sensibiliser les populations à risque et d'améliorer la prévention en ce qui a trait à l'hypertension artérielle (34).

<b>Classification de l'hypertension artérielle</b>	<b>Pression artérielle systolique (mm Hg)</b>	<b>Pression artérielle diastolique (mm Hg)</b>
<b>Normal</b>	< 120	< 80
<b>Stage précoce d'hypertension artérielle</b>	120-139	80-89
<b>Stage 1 d'hypertension artérielle</b>	140-159	90-99
<b>Stage 2 d'hypertension artérielle</b>	>160	>100

**Tableau 1 : Classification de l'hypertension en fonction de la pression systolique et diastolique selon le 6<sup>e</sup> rapport du comité national sur la prévention, la détection, l'évaluation et le traitement de l'hypertension artérielle (34)**

### **1.3.4 L'épidémiologie de l'hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle est tenue responsable d'environ 8 millions de décès par année au niveau mondial. Plus précisément, cette condition serait la cause de la moitié des décès dus aux maladies cardiaques ischémiques et la moitié des décès dus aux AVC (35). Au Canada, dans le plus récent rapport de Statistique Canada, on estime qu'environ 20% des Canadiens âgés de plus de 20 ans vivent avec un diagnostic d'hypertension artérielle. Les taux les plus élevés d'hypertension artérielle se retrouvent dans le groupe de personnes âgées de plus de 75 ans, où la moitié de la population canadienne souffre de ce syndrome (36).

### **1.3.5 L'étiologie de l'hypertension artérielle**

On distingue deux types d'hypertension artérielle, soient l'hypertension artérielle essentielle ou primaire et l'hypertension artérielle secondaire représentant respectivement 95 % et 5% des cas de patients hypertendus. L'hypertension artérielle essentielle est attribuée à des causes inconnues. Ce type d'hypertension est mis en relation avec différents facteurs tels que le vieillissement, l'obésité, la résistance à l'insuline, le tabagisme, la consommation d'alcool, une diète riche en sodium, le stress, etc. La deuxième classe d'hypertension est dite secondaire et est consécutive à une autre condition telle qu'une maladie rénovasculaire, une insuffisance rénale, un phéochromocytome, une forme de maladie mendélienne héréditaire, une grossesse ou l'effet secondaire de certains médicaments (37).

### **1.3.6 L'hypertension artérielle et les risques de maladies cardiovasculaires**

L'hypertension est en soit un facteur de risque hautement corrélé avec plusieurs maladies cardiovasculaires telles que la défaillance cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'angine et les maladies coronariennes. Parmi celles-ci, les maladies coronariennes représentent une des atteintes les plus communes et létales chez les personnes hypertendues. La corrélation entre l'hypertension et les maladies cardiovasculaires s'établit de façon continue. De telle manière, une augmentation de pression de 20/10 mm Hg double les risques d'être atteint d'une maladie cardiovasculaire chez les personnes se situant entre 40 et 70 ans (5).

### **1.3.7 Régulation physiologique de l'hypertension artérielle**

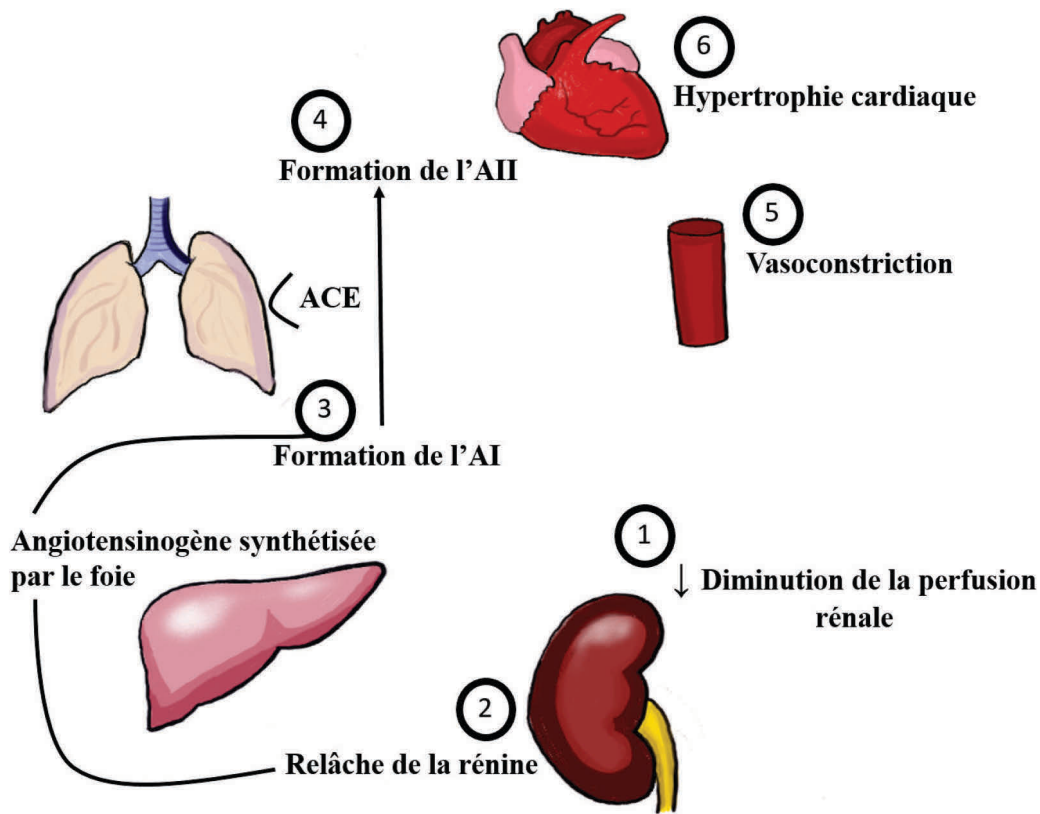
Comme la pression artérielle est définie par le produit du débit sanguin par les résistances périphériques, tous les facteurs influençant ces deux paramètres sont en mesure de changer la pression artérielle. Plusieurs mécanismes nerveux, hormonaux et mécaniques sont mis en place afin de réguler la pression artérielle. Parmi ces mécanismes, certains ont une action rapide, alors que d'autres s'effectuent sur une plus longue période de temps (9). Afin de respecter les limites de ce mémoire, nous aborderons en détails seulement les mécanismes régulateurs impliqués

dans notre modèle animal, soit le modèle de constriction aortique supra-rénale de 2 semaines chez le rat.

### **1.3.8 Régulation de l'hypertension artérielle par le système rénine-angiotensine**

La régulation de la pression artérielle peut s'effectuer via l'hormone angiotensine II (AII) qui agit à titre de vasoconstricteur dans le corps. Lorsqu'il y a une diminution du flot sanguin due à l'hypertension artérielle, cela engendre une diminution subséquente de la perfusion rénale (10, 38, 39). Cette diminution de perfusion est captée par les barorécepteurs rénaux, qui se trouvent dans l'artériole afférente du glomérule, et stimule la libération de la rénine dans le sang par les cellules juxtaglomérulaires (10, 38, 39). La rénine est une enzyme qui agit sur son substrat l'angiotensinogène, qui est libérée par le foie pour former l'angiotensine I (AI) (10, 38, 39). L'AI est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) produite dans les poumons, afin de former le peptide actif AII qui se retrouve dans la circulation sanguine systémique (10, 38, 39). L'AII agit sur différentes cibles dans le but de rétablir la pression artérielle (10, 38, 39) (figure 1.3). Parmi les actions de l'AII, on retrouve la vasoconstriction des vaisseaux, la stimulation de la sécrétion d'aldostérone, le relâchement des hormones diurétiques, la réabsorption de sodium par les tubules rénaux (9, 10, 38, 39). De plus, l'AII agit sur le cœur de façon indirecte en provoquant une hypertrophie cardiaque via l'augmentation de la pression artérielle et la post-charge sur le cœur. Par contre, l'AII par son action directe provoque une augmentation de la synthèse protéique des cardiomyocytes. De plus, l'AII et l'aldostérone provoquent la prolifération des fibroblastes cardiaques, ce qui résulte en une fibrose interstitielle et péri-vasculaire dans le ventricule gauche (40).





**Figure 1.3 : Le système rénine-angiotensine**

### 1.3.8.1 L'action locale de l'angiotensine sur le cœur

En plus de son effet dans le système endocrinien, le système rénine-angiotensine (RAS) est désormais reconnu comme ayant un effet local dans une diversité de tissus. Les différentes composantes du RAS se retrouvent dans le cœur et sont impliquées dans plusieurs pathophysiologies cardiaques incluant l'hypertrophie secondaire à l'hypertension artérielle (41). La rénine circulante est captée de la circulation par les cardiomyocytes, ce qui provoque la formation de l'AI (42). L'AI est clivée par l'ACE produite dans l'endocarde et les réseaux sanguins cardiaques, afin de former l'AII (43). L'AII est ensuite diffusée dans le myocarde et exerce un effet sur les cardiomyocytes via le récepteur à l'angiotensine AT1 et le récepteur à l'angiotensine AT2, tandis que l'effet de l'AII est seulement médié par le récepteur AT1 sur les fibroblastes cardiaques normaux (44). En conditions pathologiques, le récepteur AT2 est recruté

sur les fibroblastes cardiaques (45). L'AII au niveau cellulaire via le récepteur AT2 provoque l'hypertrophie des cardiomyocytes, puis provoque la prolifération et la sécrétion accrue du collagène par les fibroblastes cardiaques (46). Globalement, l'AII provoque un effet inotrope positif et la vasoconstriction de la circulation coronarienne (47).

### **1.3.9 Régulation mécanique cardiaque de l'hypertension artérielle**

Afin de palier à l'augmentation de pression, plusieurs mécanismes sont mis en place dans le cœur. Lorsque le retour veineux est augmenté, soit une pré-charge accrue, cela a pour effet d'augmenter le volume de sang diastolique et d'étirer le cœur (48). En réponse à ce changement hémodynamique, une adaptation aiguë du cœur consiste en l'augmentation de la force de contraction via le mécanisme de Frank-Starling (49). Ce mécanisme provoque l'augmentation de la force de contraction subséquente et permet de normaliser la pression (50). Ce phénomène d'augmentation de la force de contraction est dépendant de la longueur des sarcomères (49, 50). Lorsque la pré-charge accroît, le cœur est étiré, ce qui allonge les sarcomères (50). Cette augmentation de longueur résulte en une élévation de la force de contraction, puisque que ces deux variables sont intimement liées (50). La longueur du sarcomère influence le nombre de ponts formés entre les protéines contractiles d'actine et de myosine (50). Une longueur optimale du sarcomère permet d'augmenter les ponts formés entre ces protéines, ce qui résulte en une augmentation de la force de contraction (50). Le mécanisme de Frank-Starling est un mécanisme intrinsèque aux cardiomyocytes et permet de réguler la pression sur une faible période de temps (50)

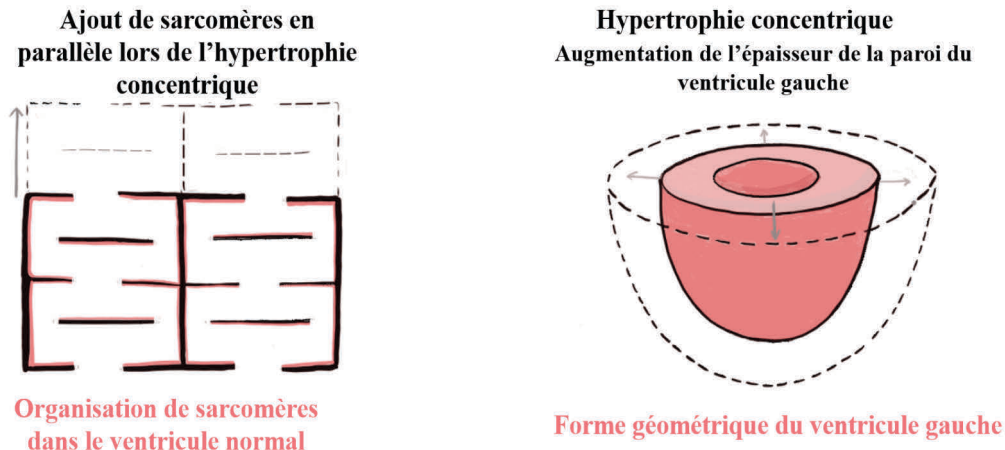
#### **1.3.9.1 L'hypertrophie concentrique**

Lorsque la pression artérielle est élevée de façon chronique, cela a pour conséquence d'augmenter la charge de travail que doit fournir le cœur afin de propulser le sang, soit la post-charge, vers les vaisseaux sanguins périphériques. Une des adaptations chroniques du cœur, afin de pallier à cette augmentation de pression, consiste à augmenter la masse musculaire cardiaque via l'hypertrophie des cardiomyocytes (48). Ce remodelage cardiaque est aussi connu sous le nom d'hypertrophie concentrique et permet au cœur de maintenir sa fonction cardiaque dans un

stade précoce de l'hypertension artérielle (48). Cette adaptation à long terme peut devenir néfaste et engendrer d'autres pathologies telles que l'insuffisance cardiaque (51).

L'augmentation de la pression systolique chronique, telle que dans une condition d'hypertension artérielle ou de sténose aortique, augmente la post-charge lors du cycle cardiaque (48). En réponse à cette surcharge de travail, le muscle cardiaque s'hypertrophie via la synthèse de *novo* sarcomères, les unités contractiles du cœur (48). Les *novo* sarcomères s'alignent de façon parallèle sur les sarcomères déjà présents, résultant en une augmentation de la largeur des cardiomyocytes, et donc de la paroi du ventricule (48) (figure 1.4). L'élargissement des cardiomyocytes est dépendant du niveau de l'augmentation de la post-charge. Par conséquent, ce remodelage cellulaire aiguë se traduit par un épaississement du mur ventriculaire gauche et une réduction de la chambre du ventricule (48). Ce patron morphologique d'hypertrophie, suite à une augmentation de la pression artérielle, représente l'hypertrophie concentrique (48).

L'hypertrophie concentrique est une réponse adaptative à l'hypertension, puisqu'elle permet de normaliser la pression exercée sur la paroi ventriculaire (48). La pression exercée sur la paroi du ventricule (PP) est dépendante de plusieurs variables telles que la pression dans le ventricule gauche (P), le rayon de la cavité du ventricule gauche (R) et l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche (EP) (52). La loi de Laplace met en relation ces variables selon la formule suivante  $PP = (P \times R) / (2EP)$  (52). Ainsi, lorsque la pression artérielle augmente, l'épaisseur du ventricule gauche augmente, ce qui permet de normaliser la pression sur la paroi. La normalisation de la pression systolique sur le ventricule prévient la défaillance de la fraction d'éjection qui est indispensable dans l'homéostasie de la pression artérielle (52).



**Figure 1.4 : L'hypertrophie concentrique**

### **1.3.9.1.1 La fibrose réactive consécutive à l'hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle provoque la relâche de l'AII dans la circulation sanguine. Comme nous l'avons décrit dans les sections précédentes, son action endocrinienne globale et locale provoque la prolifération des fibroblastes cardiaques et leur synthèse accrue de collagène (45, 46). Cela a pour conséquence d'induire une déposition excessive du collagène dans la région interstitielle et péri-vasculaire du ventricule gauche (40). Cette fibrose réactive est qualifiée de fibrose pathologique, puisque le dépôt de collagène dans cette pathologie provoque une augmentation de la rigidité cardiaque et une altération de la conduction électrique. Une accumulation excessive de collagène provoque une réorganisation des cellules musculaires et des fibres de collagène qui provoquent l'encapsulation des cardiomyocytes, ce qui a pour conséquence de diminuer la force de contraction de ceux-ci (53). Cette hétérogénéité globale du tissu provoque la détérioration progressive de la fonction contractile du cœur (40, 54).

### **1.3.9.1.2 Conséquences de la fibrose réactive et développement des arythmies**

En plus de diminuer la compliance du cœur, la fibrose cardiaque provoque la détérioration progressive de la fonction contractile en agissant à titre d'obstacle dans la propagation du courant électrique, ce qui favorise la formation de bloc de conduction et donc les arythmies ventriculaires et auriculaires (55–57). Le courant électrique est perturbé entre

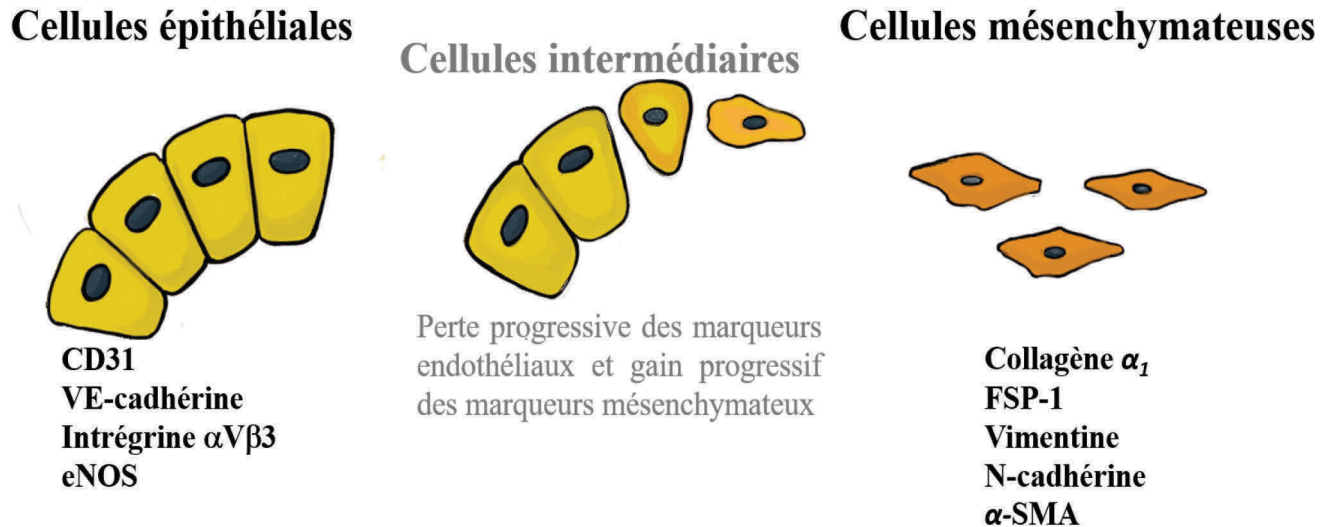
autres puisque le dépôt de collagène entre les cardiomyocytes occasionne le découplage de ces cellules excitables (56, 57). En outre, il a été démontré que le couplage électrique entre les cardiomyocytes et les fibroblastes peut contribuer aux arythmies via un remodelage des courants potassiques (K) dans les fibroblastes (56). Ce remodelage peut provoquer une diminution de la durée du potentiel d'action et l'hyperpolarisation du potentiel de repos de la membrane des cardiomyocytes (56).

## 1.4 La transition endothéliale-mésenchymateuse (EndMT)

La transition endothéliale-mésenchymateuse (EndMT) est un processus biologique qui permet aux cellules endothéliales d'acquérir un phénotype mésenchymateux (58). L'EndMT joue un rôle important dans l'apparition de fibroblastes lors du développement, lors de conditions pathologiques fibrotiques et lors de l'invasion des cancers (59–62). La transition est caractérisée par la dégradation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales associée avec la perte du phénotype endothélial, puis le détachement de la lame basale (58, 59, 63). Ensuite, plusieurs changements biochimiques se produisent et procurent des capacités migratoires, invasives et sécrétoires aux cellules endothéliales (58, 59, 63). La transition est décrite chez la cellule cible par la perte de marqueurs endothéliaux tels que la molécule d'adhésion plaquettaire (CD31), VE-cadhérine, l'intrégrine  $\alpha V\beta 3$ , l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et par le gain des marqueurs mésenchymateux, tels que collagène  $\alpha_1$ , FSP-1, N-cadhérine, vimentine et  $\alpha$ -SMA (58, 59, 63) (figure 1.5). Lors de la phase terminale de la transition, la cellule qui acquiert un phénotype mésenchymateux est alors dépourvue de marqueurs endothéliaux. Par contre, une cellule qui est en processus de transition est caractérisée par la co-expression de marqueurs endothéliaux et mésenchymateux (58, 59, 63). Ce court espace spatio-temporel ajoute une difficulté dans l'étude de ce phénomène. L'EndMT est un processus nouvellement décrit dans la littérature et demeure à bien des égards incompris. Plusieurs études tentent d'élucider les stimuli et les mécanismes sous-jacents de l'EndMT. En outre, cette transition a d'abord et largement été documentée dans la littérature en utilisant comme substrat les cellules épithéliales et a été référée comme étant la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) (64).

La signalisation de l'EndMT peut être initiée par une variété de stimuli tels que l'inflammation, l'hypoxie ou le remodelage suivant une blessure via la liaison du facteur de croissance TGF- $\beta_1$  avec son récepteur (65). Le facteur de croissance TGF- $\beta_1$  est un peptide aux rôles multiples incluant la prolifération, la migration, l'apoptose des cellules, et ce, de manière dépendante au contexte dans lequel il est exprimé (66). Sa liaison avec son récepteur active les voies de signalisation Smad, PI3K, p38MAPK et MEK/ERK, ce qui provoque l'activation de facteurs de transcriptions tels que Snail, Slug, ZEB-1, SIP-1, Twist, et LEF-1, qui sont

responsables de la répression des gènes codants pour la formation des protéines adhérentes dans la jonction serrée des cellules endothéliales (65, 67–71).



**Figure 1.5 : La transition endothéliale-mésenchymateuse (EndMT)**

#### 1.4.1 La transition inverse

Une des caractéristiques des cellules mésenchymateuses ayant subi une EMT est leur capacité à effectuer la transition inverse, soit la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) (64). La MET est un processus qui implique la perte du phénotype mésenchymateux de la cellule et le gain d'un phénotype endothélial (64). La littérature demeure pourtant incomplète en ce qui concerne la transition inverse de l'EndMT. En effet, seulement une étude a démontré que le phénotype endothélial était rétabli dans les cellules mésenchymateuses par le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) (72, 73). Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'établir la plausibilité de processus.

#### 1.4.2 Classification de l'EndMT

L'EndMT est souvent considéré comme étant une forme spécialisée d'EMT (64). Aucune classification basée sur le contexte d'apparition de l'EndMT n'a été formulée jusqu'à ce jour. Par contre, la littérature scientifique concernant l'EMT est plus détaillée à ce sujet.

L'apparition de L'EMT a été décrite dans 3 contextes différents sur lesquels une classification a été fondée. Par conséquent, l'EMT de type 1 fait référence à la contribution des cellules épithéliales dans l'apparition de fibroblastes pendant la formation de l'embryon (74). L'EMT de type 2 fait référence à la contribution des cellules épithéliales dans l'apparition de fibroblastes lors de processus fibrotiques, alors que l'EMT de type 3 fait référence à la contribution des cellules épithéliales dans l'apparition de fibroblastes lors du développement et la progression des cancers (75, 76). Parallèlement, nous retrouvons la description de l'EndMT dans ces 3 contextes dans la littérature scientifique (59–62).

#### **1.4.2.1 L'EndMT dans l'embryogénèse**

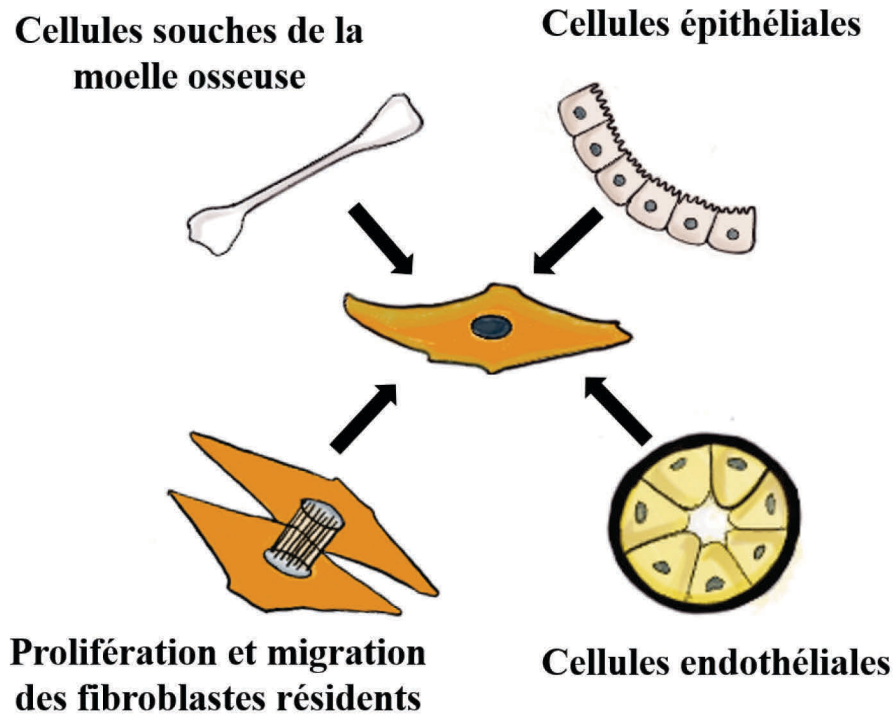
Tout comme l'EMT, l'EndMT est reconnue pour jouer un rôle dans la formation du cœur lors de l'embryogénèse (77). Suite à la gastrulation, l'ébauche primaire du cœur consiste en un tube primitif cardiaque qui est bordé de l'intérieur par les cellules de l'endocarde (78). L'endocarde est ensuite recouvert de 2 épaisseurs qui consistent en une matrice acellulaire, que l'on nomme la gelée cardiaque et le myocarde (78). Ainsi, la gelée cardiaque est placée de façon à séparer l'endocarde du myocarde (78). L'organe pro-épicarde migre afin de recouvrir le tube primitif cardiaque et cela résulte en l'organisation des 3 couches constituantes du cœur (78). À ce moment dans l'embryogénèse, le tube primitif cardiaque subit une série d'inflexions et les structures primitives des ventricules et des oreillettes se délimitent autour du canal AV (78). Les cellules endothéliales, formant le canal AV, subissent une EndMT et acquièrent un phénotype mésenchymateux (77, 78). Ce phénotype mésenchymateux permet aux cellules de migrer dans la gelée cardiaque pour former les structures des valves et du septum AV du cœur adulte (77, 78). Plusieurs études postulent que l'EndMT associée à l'embryogénèse est dépendante de la présence du facteur de croissance TGF-  $\beta_1$  (77). De plus, il a été démontré que l'expression de TGF-  $\beta_1$  est détectée dans les cellules endothéliales du canal AV qui subissent l'EndMT (79). Dans le but de confirmer le rôle du TGF-  $\beta_1$  lors de l'embryogénèse, le groupe de Nakajima a procédé à l'isolation de cellules endothéliales AV de l'embryon de souris (77). Les résultats de leur étude ont démontré que lorsque placées sur une matrice de collagène, les cellules endothéliales AV acquièrent un phénotype mésenchymateux et envahissent la matrice de collagène (77). De plus, la présence d'anticorps neutralisant le TGF-  $\beta_1$  et le TGF-  $\beta_3$  dans cette



culture provoque une réduction de la formation des cellules mésenchymateuses et, par conséquent, une réduction de l'invasion de la matrice de collagène de 75% (77).

#### **1.4.2.2 L'EndMT et son implication dans les conditions fibrotiques**

En plus de participer au développement embryonique, l'EndMT qui peut être observé lors du développement post-natal. De cette manière, l'EndMT est associée à la régénération tissulaire et le développement de la fibrose pathologique (62, 80). La fibrose est présente dans plusieurs pathologies avec diverses étiologies. En outre, la fibrose implique la prolifération et le recrutement de fibroblastes résidents qui acquièrent un phénotype actif et sécrètent de manière excessive les composantes de l'ECM (62, 80). De plus, la fibrose provoque une régulation à la baisse des gènes qui codent les enzymes de la dégradation de l'ECM. Les fibroblastes activés qui participent au développement de la fibrose pathologique proviennent de différentes origines telles que les fibroblastes résidents, les fibrocytes dérivés de la moelle osseuse, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (64) (figure 1.6). Ainsi, plusieurs études ont démontré que les cellules endothéliales étaient impliquées via l'EndMT dans l'apparition des fibroblastes activés lors de conditions fibrotiques pathologiques dans les poumons, la cornée, le rein, le foie et le cœur (80–86). Le facteur de croissance TGF- $\beta_1$  est un acteur important dans l'induction de ce processus (63). De la sorte, plusieurs pathologies fibrotiques impliquent le recrutement de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les lymphocytes qui relâchent le TGF- $\beta_1$ .



**Figure 1.6 : L'origine des fibroblastes activés lors de conditions fibrotiques**

### 1.4.2.3 L'EndMT associé au cancer

La progression des différents cancers est influencée par les cellules environnantes qui participent via le relâchement de cytokines et de facteurs de croissance tels que TGF-  $\beta_1$  et VEGF (87). Parmi les cellules qui se retrouvent dans ce microenvironnement, on distingue les fibroblastes associés au cancer (CAF) qui sont impliqués dans la croissance et l'invasion des tumeurs (88). La présence importante des CAF a suscité un intérêt quant à leur origine. Le groupe de Kalluri a récemment démontré que la présence des CAF est entre autres due à l'EndMT. Dans une étude effectuée par ce groupe, près de la moitié des CAF dans un modèle de mélanome et un modèle de carcinome pancréatique co-expriment des marqueurs endothéliaux (61). Les mécanismes sous-jacents à l'EndMT dans le cancer sont toujours inconnus. Il semblerait que la transition soit initiée par le facteur de croissance TGF-  $\beta_1$  que l'on retrouve dans une variété de cancers (89).

### 1.4.3 L'EndMT et son implication dans la fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque est impliquée dans différentes pathologies dans le cœur. La fibrose est caractérisée par un dépôt accru des composantes de l'ECM et est médiée par la présence de fibroblastes activés (90). Les fibroblastes activés à l'origine de la fibrose proviennent de différentes sources cellulaires (64). Ainsi, les cellules endothéliales peuvent agir en tant que substrat pour l'apparition de fibroblastes activés (64). L'EndMT a récemment attiré l'attention des chercheurs pour son implication dans la fibrose réactive présente dans le cœur hypertendu (62). Plusieurs études ont démontré que L'EndMT peut contribuer de manière significative dans l'apparition des fibroblastes activés dans la fibrose cardiaque et que ce processus est initié par le facteur de croissance TGF- $\beta_1$  (58, 62, 91). Sous l'action du TGF- $\beta_1$ , les cellules endothéliales migrent à l'extérieur de l'endothélium du vaisseau sanguin afin de se rendre dans l'espace interstitiel (62). Ce déplacement est associé au gain d'un phénotype mésenchymateux et permet aux cellules endothéliales de participer au processus de fibrose (62). Dans cette section, une brève revue des résultats concernant l'EndMT, impliquée dans la fibrose cardiaque in vivo, et l'EndMT en condition in vitro sera établie.

Le groupe de Zeisberg, en 2007, a investigué pour la première fois la contribution de l'EndMT, dans l'apparition des fibroblastes activés lors de la fibrose interstitielle et la fibrose péri-vasculaire cardiaque, dans une modèle de constriction aortique de 4 semaines chez la souris (62). Afin de tester leur hypothèse, le groupe de recherche a mis au point 2 modèles de souris transgéniques (62). Le premier modèle consiste en une souris, dont les cellules ayant des origines endothéliales, sont marquées avec l'expression de lacZ, alors que le deuxième modèle utilise une souris où la protéine fluorescente verte est exprimée sous le contrôle du promoteur de la FSP1 (62). Leurs résultats démontrent, via des techniques d'immunofluorescence, que 27% à 35% des cellules cardiaques co-expriment l' $\alpha$ -SMA et/ou FSP1 avec lacZ suite à une constriction aortique (62). Par conséquent, ces données suggèrent qu'un tiers des fibroblastes cardiaques proviennent d'une origine endothéliale lors de la fibrose réactive (62). Ce double marquage a permis de démontrer que 14% des cellules positives à FSP1 sont de provenance endothéliale, alors que 75% des cellules positives à l' $\alpha$ -SMA sont de provenance endothéliale (62). De plus, en établissant un co-marquage de CD31 et de lacZ, cette étude a démontré que

dans le cœur hypertendu, peu de cellules lacZ<sup>(+)</sup> co-expriment le marqueur CD31, alors que dans le cœur contrôle, la majorité des cellules lacZ<sup>(+)</sup> co-expriment le marqueur CD31 (62). Ces résultats sous-tendent que suite à la constriction aortique, les cellules ayant subi une EndMT ont perdu de façon permanente les marqueurs endothéliaux (62). Ceci indique que les cellules ont subi une transition complète vers un phénotype mésenchymateux. De plus, dans leur modèle de souris GFP-FSP1, quelques cellules co-expriment GFP et CD31 (62). Cette observation suggère la présence de cellules étant en stage précoce de l'EndMT, puisque les cellules expriment à la fois un marqueur endothélial et mésenchymateux. Afin d'élucider les mécanismes responsables de l'EndMT, une souris transgénique, ayant une délétion hétérozygote de Smad3, a été utilisée dans le but d'expliquer la contribution du facteur de croissance TGF-  $\beta_1$  par l'activation de la voie de signalisation Smad3 (62). Après une constriction aortique chez la souris Smad3<sup>+/-</sup>, une diminution des cellules mésenchymateuses provenant de l'EndMT est constatée (62).

L'étude menée par le groupe de Ghosh en 2011, a ensuite réaffirmé ce paradigme en effectuant une étude *in vitro* avec des cellules endothéliales microvasculaires de rats (58). Les auteurs de cette étude ont démontré que lorsque les cellules endothéliales microvasculaires de rats sont exposées au facteur TGF-  $\beta_2$ , elles subissent un changement de phénotype et acquièrent des caractéristiques uniques aux fibroblastes (58). Dans le but de confirmer le rôle du TGF-  $\beta_2$ , un inhibiteur du récepteur au TGF-  $\beta$  a été administré (58). L'administration de cet inhibiteur a permis de renverser le changement de phénotype démontrant l'implication du TGF-  $\beta$  dans ce processus (58).

À l'opposé des études précédemment citées, le groupe de Moore-Morris a démontré que l'EndMT ne contribue pas au processus de fibrose cardiaque qui est secondaire à une constriction aortique (29). Afin d'examiner la présence de cellules ayant subi une EndMT, le groupe de Moore-Morris a employé différentes combinaisons de souris transgéniques (29). Cette étude a permis de déterminer les pourcentages des fibroblastes qui proviennent de l'endothélium et de l'épicarde pendant la formation de l'embryon (29). Suite à la constriction aortique, le ratio des pourcentages de chaque population est maintenu, ce qui suggère que le programme d'EndMT n'est pas activé (29). L'augmentation proportionnelle des fibroblastes provenant des cellules endothéliales reflète donc la prolifération des fibroblastes résidents (29).

## **1.5 La protéine filamenteuse nestine**

La protéine nestine appartient à la classe VI des filaments intermédiaires. Elle a été identifiée en premier lieu dans les cellules souches neuroépithéliales lors du développement du système nerveux central (92, 93). La protéine nestine est considérée comme étant une grosse protéine avec un poids moléculaire de 240 kDa, qui contient plus de 1600 acides aminés (94). Cette protéine est incapable de s'homodimériser, puisqu'elle possède une courte région N-terminale, soit de 6 acides aminés (95). Ainsi, la protéine nestine sous sa forme fonctionnelle s'hétérodimérise avec différents filaments intermédiaires tels que vimentine et desmine (96, 97). Le filament intermédiaire, avec lequel la protéine nestine s'associe, est dépendant de la cellule hôte dans laquelle elle est présente (96, 97). La région C-terminale de la protéine nestine est considérée comme étant très longue, soit d'environ 1400 acides aminés, et permet à la protéine de former des complexes avec les éléments du cytosquelette (98). Chez le rat, le gène de la protéine nestine est formé de 5945 paires de bases et comprend 5 exons et 4 introns (92). Plusieurs études ont démontré le rôle fonctionnel de l'intron 1 et de l'intron 2 dans l'expression de la protéine nestine, alors que le rôle de l'intron 3 et de l'intron 4 restent inconnus (99–101). Les amplificateurs de l'intron 2 du gène nestine sont responsables de l'expression de la protéine nestine dans les cellules souches neurales progénitrices prolifératives, que l'on retrouve dans le développement du système nerveux central (99–101). Cet amplificateur est aussi responsable de la présence de nestine dans les cellules souches progénitrices dérivées de la peau et dans les cellules précurseurs neurales que l'on retrouve dans le muscle squelettique (99–101). Les amplificateurs de l'intron 1 du gène nestine sont responsables de l'expression de la protéine nestine dans les fibres musculaires squelettiques et dans les cellules endothéliales (99–101). Les introns sont impliqués dans la régulation de l'expression de la protéine nestine de façon spécifique au type cellulaire (99–101).

### **1.5.1 L'expression de la protéine nestine dans le corps**

L'expression de la protéine nestine a d'abord et principalement été associée avec les cellules souches progénitrices neurales qui se différencient en neurones et en cellules gliales lors du développement du système nerveux central (102). Depuis sa découverte, l'expression de

la protéine nestine s'est vue étendue au-delà du système nerveux. La protéine nestine a été identifiée dans le développement de multiples composantes de notre système telles que le muscle squelettique, les dents, les yeux, les reins, le pancréas et le cœur (103–108). De plus, dans les tissus matures, la protéine nestine a été identifiée dans diverses populations de cellules souches progénitrices résidentes de plusieurs organes (109–114). La protéine nestine a récemment été identifiée dans certaines cellules cancéreuses associées aux tumeurs cérébrales, mammaires, testiculaires, pancréatiques et thyroïdiennes (115–119).

De façon générale, l'expression de la protéine nestine est associée avec les cellules mitotiques dans le développement. Lorsque les cellules se différencient, l'expression de nestine est diminuée, puisque ce filament intermédiaire est remplacé par d'autres filaments intermédiaires qui sont spécifiques à la cellule mature (94, 120). Suite au développement, l'expression de nestine demeure faible et elle est souvent associée à une population de cellules souches progénitrices résidentes dans différents organes (109–114). La réexpression de la protéine nestine dans les cellules matures est associée avec la régénération tissulaire et la prolifération cellulaire qui surviennent suite à une blessure ou un stress de nature pathologique (94). Les cellules souches progénitrices nestine<sup>(+)</sup> pourraient agir à titre de réserve cellulaire des tissus endommagés et, de ce fait, contribuer à la régénération tissulaire. Ces cellules souches progénitrices possèdent la capacité de se différencier en cellules matures du tissu auquel elles appartiennent (121). De nouvelles données ont démontré que la protéine nestine est impliquée dans la progression des cancers et est associée avec le degré d'agressivité des cancers (115–119). Toutefois, les mécanismes sous-jacents à l'expression de la protéine nestine lors du développement et de la prolifération cellulaire pourraient être similaires lors du développement des cellules cancéreuses (122).

### **1.5.2 L'expression de la protéine nestine dans le cœur**

Une décennie suivant sa découverte dans le système nerveux, la protéine nestine a été identifiée dans le cœur de rat lors de la formation de l'embryon (108). L'expression de cette protéine est observée de manière spatio-temporelle lors de la période mi-embryonique chez les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires (108). La fonction de la protéine nestine dans le

développement de l'embryon demeure toutefois inconnue (108). En condition physiologique, plus précisément lors du développement néo-natal cardiaque, la protéine nestine est détectée dans les fibroblastes ventriculaires (123). Son expression est régulée à la baisse dans les fibroblastes ventriculaires lors de la croissance post-natale du cœur (123). Dans le cœur adulte normal, l'expression de la protéine nestine est limitée à une population de cellules souches neurales progénitrices (124, 125). Ainsi, les résultats de notre laboratoire ont démontré qu'une population de cellules souches neurales progénitrices nestine<sup>(+)</sup> se retrouve intercalée entre les cardiomyocytes, dans les ventricules et les oreillettes (101). Suivant un accident ischémique, cette population de cellules est augmentée dans la cicatrice et la zone péri-infarctée (124–126). La plasticité de ces cellules, dans la phase aigüe du remodelage cardiaque suivant un infarctus du myocarde, est observée par leur implication tant au niveau de l'angiogenèse qu'au niveau de la neurogenèse (101). Les cellules souches neurales progénitrices nestine<sup>(+)</sup> migrent vers la cicatrice et agissent à titre de substrat dans la formation de *novo* vaisseaux sanguins via leur capacité à se différencier en cellules vasculaires (125). De plus, ces mêmes cellules participent à l'innervation de la cicatrice et la région péri-infarctée via leur capacité à se différencier en cellules neuronales (127). En plus d'être exprimée dans les cellules souches neurales progénitrices suivant l'infarctus du myocarde, la protéine nestine est détectée dans une sous-population de cardiomyocytes bordant la cicatrice et dans une sous-population de fibroblastes activés qui participent à la formation de la cicatrice (123, 124, 128). La présence de nestine dans les cardiomyocytes demeure pour le moment inexplicée, tandis que l'expression de nestine dans les fibroblastes activés leur confère un avantage prolifératif.

### **1.5.3 Le rôle de la protéine nestine dans les fibroblastes**

Notre laboratoire a démontré que la protéine nestine est fortement exprimée dans les fibroblastes néonataux ventriculaires et que son expression est régulée à la baisse lors de la croissance post-natale chez le rat (123). La protéine nestine est faiblement exprimée dans les fibroblastes adultes et est ré-exprimée dans les fibroblastes activés suivant un accident ischémique (123). Après avoir isolé les fibroblastes de la cicatrice des rats ayant subi un infarctus du myocarde, les résultats de notre laboratoire ont démontré que 37 % des fibroblastes étaient immunopositifs à l'expression de la protéine nestine. De façon comparative, 7% des

fibroblastes de cœur normaux et 86 % des fibroblastes néonataux sont positifs à l'expression de nestine (123). Dans la même étude, la présence de cette protéine dans les fibroblastes est associée avec un phénotype prolifératif. La synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN), mesurée par l'incorporation de thymidine-H3, est augmentée significativement dans les fibroblastes isolés de la cicatrice et les fibroblastes néonataux, comparativement aux fibroblastes normaux (123). De plus, le blocage partiel de la protéine nestine dans les fibroblastes néonataux provoque une diminution de la synthèse d'ADN (123). Cette étude suggère que la protéine nestine est impliquée dans la prolifération des fibroblastes néonataux et pourrait être impliquée dans la prolifération des fibroblastes lors du processus de fibrose réparative.

#### **1.5.4 Le rôle de la protéine nestine dans l'EMT**

La présence de la protéine nestine est répertoriée dans une variété de cancers et son niveau d'expression est corrélé avec la malignité et l'agressivité des tumeurs cérébrales, des tumeurs gastro-intestinales, du cancer des poumons, du cancer du sein et du cancer de l'utérus (129–133). L'étude de coupes histologiques de tumeurs de patients, ayant différents pronostics, a permis d'établir un lien direct entre l'expression de nestine et le niveau de risque associé aux faible taux de survie des patients (129–133). La protéine nestine promeut la progression et la migration des cancers par son implication dans les propriétés motiles, invasives et métastatiques des cellules (134, 135). Puisque l'EMT est un processus impliqué dans l'invasion et la progression des cancers, plusieurs études ont tenté d'élucider le rôle de la protéine nestine dans ce processus. Dans cet ordre d'idée, le groupe de Hagio a démontré qu'une surexpression de la protéine nestine, dans deux lignées de cellules provenant d'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC), provoque l'induction de l'EMT. Par opposition, la suppression de la protéine nestine favorise le maintien du phénotype épithélial (136). Ce paradigme a ensuite été réaffirmé par le groupe de Su qui a révélé que la suppression de la protéine nestine *in vitro* réduit significativement l'incidence et le volume de la tumeur (137). De plus, dans les PDAC, la protéine nestine est régulée par la voie de signalisation Smad via l'activation du facteur TGF- $\beta_1$ , qui est également responsable de l'induction de l'EMT associée aux cancers (137). La régulation de l'EMT via l'expression de nestine a aussi été établie dans un modèle d'adénocarcinome gastrique (138).



En plus de corréler avec la présence de l'EMT de type 3 associée aux cancers, l'expression de la protéine nestine est aussi détectée dans l'EMT de type 2, associée avec la fibrose pathologique (139, 140). La régénération de la glande lacrymale suivant une lésion induit la formation de cellules mésenchymateuses via l'EMT (140). De plus, l'expression de la protéine nestine est augmentée dans ce modèle et est associée à la phase de cicatrisation (140). Dans cette étude, l'induction de la protéine nestine est corrélée avec la présence de la protéine vimentine (140). Ces protéines, qui sont connues pour former un hétérodimère, sont impliquées dans la migration des cellules mésenchymateuses vers le site endommagé (140). La présence de la protéine nestine a aussi été répertoriée dans le processus d'EMT, lors de conditions de fibroses rénales et pulmonaires (139, 141–143). De plus, des résultats de notre laboratoire ont permis d'établir la présence de la protéine nestine dans une sous-population de cellules mésenchymateuses provenant de l'EMT, lors du processus de fibrose réactive dans une condition d'hypertension pulmonaire expérimentale secondaire à l'hypoxie (article en soumission). La mise en culture de cellules épithéliales pulmonaires a permis de confirmer ce paradigme. Lorsque le sérum a été retiré du milieu de culture, les cellules épithéliales ont subi une EMT associée avec l'expression de collagène  $\alpha_1$  et de la protéine nestine. Nous avons également démontré que le facteur TGF-  $\beta_1$  est sécrété par les cellules épithéliales pulmonaires et provoque l'EMT. De plus, l'ajout du rh-BMP7 au milieu de culture renverse le changement de phénotype associé avec l'EMT. Par ailleurs, ce modèle est caractérisé par la présence de cellules endothéliales CD31<sup>(+)</sup> qui sont déplacées des vaisseaux dont l'intégrité de l'endothélium est compromise. Ces cellules co-expriment les marqueurs du collagène  $\alpha_1$  et de la protéine nestine. La présence de ces cellules suggère que l'EndMT peut constituer une source supplémentaire dans l'apparition des cellules mésenchymateuses lors la fibrose pulmonaire.

Malgré les évidences de la présence de nestine associée avec le processus d'EMT, plusieurs études doivent être réalisées afin d'élucider la présence et le rôle de cette protéine dans le processus analogue d'EndMT.

## OBJECTIFS

Les maladies cardiovasculaires se situent dans les premières causes de décès au Canada. L'hypertension artérielle est parmi les facteurs de risques les plus importants quant au développement des maladies cardiovasculaires. L'hypertension artérielle induit un remodelage cardiaque important chez les patients qui en souffrent. L'hypertrophie cardiaque concentrique caractérise la phase aiguë du remodelage via l'épaississement du ventricule gauche et le dépôt accru du collagène dans la zone interstitielle et péri-vasculaire. Ce dépôt de collagène est nommé fibrose réactive. Il s'agit d'un processus néfaste puisqu'il provoque l'augmentation de la rigidité cardiaque et la détérioration progressive de la fonction contractile du cœur. Le processus de fibrose réactive peut être une cible thérapeutique intéressante en synergie avec un traitement pour diminuer la pression artérielle, puisqu'en diminuant le dépôt de collagène dans le cœur hypertendu, il serait possible d'améliorer la fonction cardiaque des patients.

La fibrose réactive peut être régulée via l'entremise des cellules impliquées dans ce processus, soit les myofibroblastes cardiaques. Il a été démontré par notre laboratoire que la protéine nestine joue un rôle important dans la prolifération des myofibroblastes lors de conditions de fibroses réparatives (123). De plus, la protéine nestine est présente dans différentes conditions fibrotiques qui surviennent suite à une blessure. Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de la protéine nestine corrèle avec le niveau de fibrose. Dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents à la prolifération des myofibroblastes, et par conséquent, la progression de la fibrose réactive cardiaque, nous avons émis l'hypothèse que la protéine nestine est un marqueur des myofibroblastes dans le processus de fibrose réactive.

Les objectifs de cette étude sont de déterminer si la protéine nestine est un marqueur des myofibroblastes dans un modèle de fibrose réactive et de déterminer les origines cellulaires impliquées dans l'apparition des myofibroblastes. Afin de répondre à nos objectifs, nous avons mis au point un modèle de rats hypertendus suivant une procédure de constriction aortique. Après deux semaines, la constriction aortique mène au développement de l'hypertrophie concentrique et à une déposition importante de collagène dans la région interstitielle et péri-vasculaire du ventricule gauche.

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## **2.1 Manipulation des animaux**

Les protocoles de recherche respectent les directives et les règles d'éthique du Conseil Canadien de Protection des Animaux et ont été approuvés par le Comité de Déontologie Animale du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Les résultats présentés dans ce mémoire ont été effectués à partir de rats Sprague-Dawley (Charles Rivers) qui ont subi une procédure de constriction aortique supra-rénale (CAS). Suivant la procédure, les rats ont été maintenus en vie pendant 2 semaines. L'objectif de ces recherches cible le remodelage aigu du cœur suite à l'hypertrophie concentrique consécutive à l'hypertension artérielle. Les rats ayant subi une CAS ont été comparés avec un groupe de rats témoins, soit le groupe de rats sham.

### **2.1.1 Protocole expérimental du modèle Constriction Aortique Supra-rénale**

La procédure de CAS a été exécutée sur des rats mâles Sprague-Dawley, âgés entre 9 et 11 semaines. Les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane 5% (Baxter) à un débit de 1 Umin d'oxygène (O<sub>2</sub>) qui a été ensuite réduit à un taux d'isoflurane de 1,5% lors de la procédure. Avant de commencer la chirurgie, une dose de buprénorphine de 0,01mg/kg (Temgesic) a été administrée de façon sous-cutanée aux animaux. L'abdomen des rats a été rasé et aseptisé avec de la Chlorhexidine 0,5% (Dexidin 0.5, Laboratoires Atlas 46 Inc.) et une incision d'environ 2 cm a été réalisée sur le site de la chirurgie. Les pans musculaires ont été séparés afin de dégager la région aortique abdominale située en position proximale à l'artère rénale. L'aorte a été isolée des tissus conjonctifs et une constriction a été réalisée en nouant une soie de suture 6-0 (Johnson & Johnson) autour d'une aiguille de calibre 22G (Becton Dickinson) positionnée contre le segment aortique supra-rénale. L'aiguille a ensuite été retirée, réduisant le diamètre de l'aorte au diamètre de l'aiguille de calibre 22G. Une fois la constriction effectuée, la cavité abdominale a été remplie à l'aide de 3 mL de saline stérile contenant 0,9% de sodium de chlorure. Les pans musculaires ont été refermés par une suture de points simples séparés, réalisée à l'aide d'une soie 3-0 montée sur aiguille atraumatique (Ethicon). Ensuite, la peau de l'animal a été agrafée en utilisant des agrafes cutanées (Autoclip, Becton Dickinson). Suite à la chirurgie, deux doses de buprénorphine ont été injectées sous-cutanée à un intervalle de 6 heures. Les procédures de

chirurgie des rats du groupe sham ont été effectuées de la même façon, à l'exception qu'aucune soie n'a été nouée autour de l'aiguille de calibre 22G.

### **2.1.2 Mesure des paramètres hémodynamiques**

La mesure des paramètres hémodynamiques a été réalisée afin d'obtenir les pressions ventriculaires, veineuses et artérielles des animaux avant de procéder aux sacrifices des rats, soit 2 semaines suivant la chirurgie. Les rats ont été anesthésiés avec un mélange de Kétamine (50 mg/kg, Ketalean, Bimeda-MTC) et de Xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer), puis ils ont été placés en position dorsale. Une incision d'environ 1 cm a été réalisée au niveau du larynx afin de dégager l'artère carotidienne droite sur une longueur de 5 mm. Les extrémités distales et proximales de la région isolée ont été resserrées à l'aide d'une soie de suture 4-0 (Ethicon) de façon à arrêter temporairement la circulation. Ensuite, une incision a été réalisée avec l'aide de ciseaux chirurgicaux sur l'artère carotidienne, permettant l'insertion d'un cathéter de pression haute-fidélité (Millar Instruments) qui enregistre les pressions via le système d'interface Polygraph Powerlab (AD Instruments) dans l'artère carotidienne, le ventricule gauche et le ventricule droit. La mesure des paramètres hémodynamiques a été effectuée pendant une période de 30 secondes et a permis de mesurer la pression artérielle moyenne (PAM), la pression systolique du ventricule gauche (PSVG), la pression systolique du ventricule droit (PSVD), la vitesse de contraction du cœur (+dP/dt) et la vitesse de relaxation du cœur (-dP/dt).

### **2.1.3 Sacrifices**

Une fois les mesures des paramètres hémodynamiques effectuées, les rats ont été sacrifiés afin de procéder à l'extraction du cœur. Les animaux ont été anesthésiés selon la méthode décrite dans la section précédente et une incision cutanée d'environ 5 cm a été réalisée sur leurs abdomens préalablement désinfectés avec de la Chlorhexidine 0,5%. Une seconde incision a été réalisée sur les pans musculaires des rats afin de découvrir la cavité de l'abdomen. Ensuite, le diaphragme a été perforé de façon à ce que le cœur puisse être prélevé.

#### **2.1.4 Prélèvement des tissus**

Différentes techniques de conservation des tissus ont été appliquées aux cœurs prélevés en fonction des expériences à exécuter. La première technique consiste à conserver les cœurs de rats dans le 2-Méthylbutane (Sigma Aldrich) afin de procéder à des coupes tissulaires au cryostat qui sont utilisées pour les procédures d'immunofluorescence telles que décrites à la page 55, dans la section 2.2.5 : *Immunofluorescence et microscopie confocale sur tissus conservés dans le 2-Méthylbutane*. La seconde technique consiste à fixer les cœurs de rats dans une solution de formaline 10% (Chaptec) afin d'effectuer des coupes à la paraffine qui sont utilisées pour les procédés d'immunofluorescence et d'immunohistochimie telles que décrites à la page 54 et 56, dans la section 2.2.2 : *Histologie des cœurs* et dans la section 2.2.6 : *Immunofluorescence et microscopie confocale sur tissus conservés dans le 2-Méthylbutane*. La troisième technique consiste à isoler les ventricules gauches des cœurs de rats dans le but d'effectuer les immunobuvardages de type Western Blot. Finalement, la dernière technique consiste à prélever les ventricules gauches des cœurs de rats et de les conserver dans le Hank's Balanced Salt Solution 1X (HBSS, GE Healthcare Life Sciences) afin de procéder à l'isolation des fibroblastes cardiaques.

## **2.2 Utilisation des tissus**

### **2.2.1 Coupe au Cryostat**

Les cœurs conservés dans le 2-Méthylbutane à  $-80^{\circ}\text{C}$  ont été enrobés avec un composé d'O.C.T (Optimal cutting temperature, Tissue-Tek), puis apposés sur une cryocassette. La cryocassette a été plongée dans l'azote liquide afin de solidifier l'O.C.T. La cryocassette a été installée sur le bras mécanique du cryostat (Shandon) et des coupes transversales de 14 microns ont été effectuées. Les coupes ont été collectées et apposées sur des lames de microscope (Fisher Scientific). Les lames ont été par la suite conservées dans une boîte hermétique à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Après utilisation, les tissus ont été enrobés de nouveau dans l'O.C.T et conservés dans une nouvelle solution de 2-Méthylbutane.

### **2.2.2 Histologie des cœurs**

Les cœurs fixés dans une solution de formaline 10% ont été envoyés au département d'histologie du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, afin d'être coupés et montés sur des lames. Dans un premier temps, les cœurs ont été déshydratés grâce à différentes solutions d'éthanol (Fisher Scientific), éclaircis avec du xylène (Sigma Aldrich) et imprégnés en paraffine. Les cœurs imprégnés ont été ensuite plongés dans un bain de paraffine afin d'obtenir un bloc. Des coupes tissulaires, entre 5 et 10 microns, ont été effectuées au microtome. Les lames blanches ont été utilisées pour des expériences d'immunofluorescence. Les lames colorées à l'aide de Trichrome de Masson ont été utilisées pour quantifier le dépôt de collagène au niveau du cœur dans les différents groupes de rats. Finalement, les lames colorées à l'Hématoxyline Phloxine Safran (HPS) ont été utilisées pour les analyses morphométriques.

### **2.2.3 Mesures morphométriques des cœurs de rats**

Les lames ayant subi une coloration à l'HPS ont été utilisées pour mesurer les différents paramètres morphométriques des cœurs. Les cœurs prélevés des rats ont été coupés de façon transversale au milieu de l'axe longitudinale. À partir de l'axe coupé, des coupes tissulaires, entre 5 et 10 microns, ont été effectuées vers l'apex et vers la base du cœur. Afin de déterminer l'épaisseur du ventricule gauche des photos des lames ont été effectuées à l'aide du Microscope Zoom Stéréo d'Olympus SZX7 à un grossissement de 0.4 X. Pour chaque cœur analysé, 4 photos de coupes transversales ont été prises. Les images ont été analysées avec le programme Stream Basic afin d'obtenir l'épaisseur du ventricule gauche. Pour chaque cœur, l'épaisseur du ventricule gauche est mesurée à 10 endroits sur chaque photo. La valeur représentant l'épaisseur est la moyenne des 40 mesures prises.

### **2.2.4 Quantification du collagène dans le tissu cardiaque**

Les lames ayant subi une coloration au trichrome de Masson ont été utilisées afin de mesurer la fraction de collagène dans les cœurs du groupe de rats CAS et les cœurs du groupe de rats sham. La coloration au trichrome de Masson permet de visualiser les fibres de collagène

en bleu. Pour chaque cœur analysé, 50 photos ont été prises sur 5 différentes coupes, à la fois pour la région interstitielle et la région péri-vasculaire. Les photos des lames ont été effectuées à l'aide d'un Microscope Olympus CKX41 avec une caméra Olympus QICAM colour. Les images des ventricules gauches et des vaisseaux sanguins ont été captées à un grossissement de 20X et ont été analysées avec le programme Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics). Les acquisitions ont été prises avec les mêmes paramètres à des fins comparatives. Une segmentation pour la couleur bleue a été établie à partir de plusieurs photos de cœurs qui sont marqués par une grande quantité de collagène. Sur ces photos, chaque pixel correspondant à la couleur bleue a été sélectionné. La segmentation pour la couleur bleue a ensuite été appliquée à toutes les photos afin de collecter la mesure de l'aire de la couleur bleue. Ensuite une segmentation de la couleur rouge a été établie. Afin de collecter l'aire totale du tissu, nous appliquons sur chaque photo les segmentations de la couleur bleue et de la couleur rouge. Pour chaque image, la valeur de l'aire du collagène mesurée (coloration bleue) a été normalisée avec l'aire totale du tissu visible dans le champ (coloration bleue et rouge). L'aire totale du tissu cardiaque comprend les régions occupées par le collagène mais exclut les espaces vides dont la lumière des vaisseaux sanguins. La valeur du collagène sur la valeur de l'aire totale a ensuite été multipliée par un facteur de 100.

### **2.2.5 Immunofluorescence et microscopie confocale sur tissus conservés dans le 2-Méthylbutane**

Les lames des tissus conservés dans l'O.C.T ont préalablement été fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% (Sigma), de pH 7,2 à base de tampon phosphate salin (PBS 1X), pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les lames ont été lavées à trois reprises, pour une durée de 5 minutes, dans le PBS 1X. Les coupes ont été par la suite délimitées grâce à un crayon à encre hydrophobe (Pap-Pen, Sigma Aldrich) et une solution de blocage de PBS 1X a été appliquée sur chaque tissu, contenant 0,5 % de Triton X-100 (Sigma Aldrich) et 2 % de *normal goat serum* ou de *normal donkey serum* (NGS, NDS, Jackson Laboratories). Les tissus ont été incubés pendant 1 heure à la température de la pièce, et ensuite 12 heures, à 4°C avec une solution de PBS 1X contenant 0,1% de Triton X-100, 1% de NGS/NDS et les anticorps primaires. Le lendemain, les lames ont été lavées à trois reprises pour une durée de 5 minutes



dans le PBS 1X. Le contour des tissus a été tracé à nouveau avec le crayon à encre hydrophobe, puis une solution de PBS 1X, contenant 0,1% de Triton X-100, 1% de NGS/NDS et les anticorps secondaires a été appliquée pour une durée de 90 minutes à température pièce dans la noirceur. Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (Invitrogen) ou avec le marqueur DAPI (4' 6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma) à une concentration de 1µL par mL. Toujours en absence de lumière, les lames ont été lavées, à trois reprises, dans une solution de PBS 1X, pour une durée de 5 minutes. Par la suite, 10 µL de solution de montage ont été déposés sur chaque tissu. La solution de montage est constituée d'une solution de DABCO 0,4% (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, SIGMA) diluée dans une solution de PBS 10X, qui est par la suite complétée avec 9 volumes de glycérol (Sigma). Une lamelle de verre a été apposée sur le milieu de montage et a été scellée grâce à l'application de vernis à ongle. Des contrôles positifs et négatifs ont été effectués pour chaque expérience afin de s'assurer d'un signal spécifique. Les expériences ont été visualisées avec un microscope confocale LSM510 Zeiss en utilisant la plateforme Zeiss LSM Image Browser.

Anticorps	Hôte	Format	Compagnie	Numéro de catalogue	Concentration	Dilution
nestine clone rat-401	Souris	Monoclonale	EMD Millipore	MAB353	100µg/mL	1 :150
PECAM-1 (CD-31)	Chèvre	Polyclonale	Santa Cruz	Sc-1506	200µg/mL	1 :100
Collagène alpha 1	Lapin	Polyclonale	Abcam	AB34710	1mg/mL	1 :200
Anti- Lapin Conjugué à l'Alexa Fluor 488	Chèvre	Polyclonale	Invitrogen	A11008	2mg/mL	1 :800
Anti-Souris Conjugué à l'Alexa Fluor 555	Chèvre	Polyclonale	Invitrogen	A21422	-	1 :800
Anti-Poulet Conjugué à l'Alexa Fluor 488	Chèvre	Polyclonale	Invitrogen	A21441	2mg/mL	1 :800
Anti- Chèvre Conjugué à l'Alexa Fluor 488	Âne	Polyclonale	Invitrogen	A11055	2mg/mL	1 :800
Anti-Souris Conjugué à l'Alexa Fluor 555	Âne	Polyclonale	Invitrogen	A31571	2mg/mL	1 :800
Anti- Lapin Conjugué à l'Alexa Fluor 555	Âne	Polyclonale	Invitrogen	A31572	2mg/mL	1 :800

## **Tableau 2.1 : Anticorps utilisés pour les procédés d'immunofluorescence**

### **2.2.6 Immunofluorescence et microscopie confocale sur tissus enrobés dans la paraffine**

Les lames enrobées dans la paraffine ont subi un procédé de réhydratation, qui consiste en 4 bains de xylène pour une durée de 5 minutes chacun, suivi de 2 bains avec d'alcool 100%, 1 bain d'alcool 95% et 1 bain d'alcool 75%, pour une durée de 3 minutes chacun. Par la suite, les lames sont incubées à 2 reprises dans un bain d'eau distillée pour une durée de 2 minutes. Une fois les lames réhydratées, elles sont traitées dans l'*Antigen Retrieval* pour 30 minutes à 100°C. Ce procédé permet de briser les liens entre les protéines, qui sont formées par la fixation dans une solution de formaldéhyde, et de découvrir les sites antigéniques. Par la suite, une solution de blocage, une solution d'anticorps primaires et une solution d'anticorps secondaires ont été appliquées tel que décrit lors de la section précédente (voir le tableau 2.1 pour les concentrations d'anticorps utilisées).

### **2.2.7 Préparation de lysats de protéines à partir de tissu**

Les lysats de protéines ont été préparés à partir des cœurs de rats sham et CAS. Les tissus prélevés des animaux ont été immédiatement placés dans des microtubes (Eppendorf) et conservés à -80°C. Au moment de l'utilisation, les tissus sont disséqués afin d'obtenir des morceaux d'environ 250 mg qui ont ensuite été placés dans 1 mL de tampon de lyse. Les tissus ont été homogénéisés avec l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik). Les homogénats ont été ensuite centrifugés à 10 000 RPM, pour une durée de 10 minutes à 4°C, puis les surnageants ont été prélevés. La concentration des surnageants a été mesurée selon la méthode de Bradford.

### **2.2.8 Immunobuvardage de type Western**

Les lysats de protéines entre 30 µg et 50 µg ont été dilués dans un volume d'eau stérile de 7,5 µL, complété à 15 µL, avec une solution de Laemmli Buffer 2X (Bio-Rad laboratories)

contenant 5% de 2-Mercaptoéthanol (Sigma Aldrich). Les échantillons ont ensuite été chauffés 5 minutes à 100°C dans un appareil PTC-100 (Programmable Thermal Controller, MJ Research) et ont été placés dans les puits d'un gel de polyacrylamide 15% qui a subi une migration de 100 volts pour une durée de 2 heures. Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Bio-Rad laboratories), prétraitée au méthanol, pour une durée de 1h45 à 100 volts. La membrane contenant les protéines a été incubée dans une solution de blocage constituée de lait écrémé 5% et de Tween20 0,01% (Sigma Aldrich) pour une durée de 1 heure. Par la suite, la membrane a été incubée dans une solution de blocage avec les anticorps primaires pendant une durée de 12 heures à 4°C. Le lendemain matin, la membrane a été lavée, à trois reprises, avec une solution de PBS 1X Tween20 0,01%, pour une durée de 10 minutes. Ensuite, la membrane a été incubée dans une solution de blocage, contenant les anticorps secondaires appropriés. Finalement la membrane a été incubée dans une solution ECL (Enhanced ChemiLuminescent, Thermo Scientific), pendant 1 minute, et a été révélée sur un hyperfilm (GE Healthcare Life Sciences) sensible aux signaux chimiluminescents. L'hyperfilm a été analysé avec l'interface d'Image J et chaque signal protéique a été normalisé en fonction du signal de la protéine GAPDH.

Anticorps	Hôte	Format	Compagnie	Numéro de catalogue	Concentration	Dilution
nestine clone rat-401 PECAM-1 (CD-31)	Souris	Monoclonale	EMD Millipore	MAB353	100µg/mL	1 :500
	Chèvre	Polyclonale	Santa Cruz	Sc-1506	200µg/mL	1 :500
Alpha actine du muscle lisse GAPDH	Souris	Monoclonale	Sigma Aldrich	A2547	-	1 :5000
	Souris	Monoclonale	Ambion	AM4300	4mg/mL	1 :500 000
Anti-Lapin HRP	Chèvre	Monoclonale	Cell Signaling	7074S	-	1 :25 000
Anti-Souris HRP	Chèvre	-	Life Technologies	7076S	-	1 :25 000
Anti-Chèvre HRP	Âne	Polyclonale	Santa Cruz	Sc-2020	200µg/mL	1 :10 000

**Tableau 2.2 : Anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western Blot**

## 2.3 Études cellulaires

Les cellules endothéliales microvasculaires de rats ont été achetées chez la compagnie *Cell Biologics* et cultivées selon les recommandations du fournisseur, alors que les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines proviennent de la compagnie *Lonza* et nous ont été offertes par le laboratoire du docteur Jonathan Ledoux, situé à l'Institut de Cardiologie de Montréal.

### 2.3.1 Isolation et prolifération des fibroblastes cardiaques

Lors de la procédure de sacrifice, les ventricules gauches des cœurs de rats ayant subi une CAS et les ventricules gauches de cœurs de rats sham ont été isolés et préservés dans une solution de HBSS sur glace. La fraction du cœur recueillie a été coupée en morceaux d'environ 2 mm<sup>2</sup> et lavée à deux reprises avec une solution de HBSS. Les morceaux de cœurs ont été placés dans une solution de HBSS contenant 0,1% de Trypsine (Gibco). La solution a été placée à 4°C, pour une durée de 12 heures, sur une plaque agitatrice. Après cette période, 10 mL d'une solution de sérum bovin foetal 7% (FBS, Thermo Fisher Scientific) et de Pénicilline Streptomycine 2% (Thermo Fisher Scientific) diluée dans le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) a été ajoutée à la bouteille contenant la fraction de cœur découpée pour une durée de 10 minutes à la température de la pièce. Par la suite, les morceaux de cœurs ont été déposés dans une solution de collagénase de type II (Gibco) 0,1%, diluée à partir d'une solution de HBSS, à 37 °C, pour une période variant de 1 minute à 10 minutes, jusqu'à ce que la solution soit trouble. La solution contenant les cellules en suspension a été prélevée et conservée sur glace. La digestion a été effectuée à 5 reprises, sur la même fraction, en utilisant une nouvelle solution de collagénase à chaque fois. Une fois la digestion terminée, les tubes contenant les cellules en suspension ont été centrifugés, à 5000 RPM, pour une durée de 5 minutes. Les culots ont été récoltés et dissous dans une solution de HBSS qui a été centrifugée à nouveau, selon les mêmes paramètres. Cette étape a été effectuée à deux reprises, avant que le culot soit dissout dans une solution de DMEM FBS 7%. Les cellules ont été dénombrées avec l'aide d'un hémocytomètre (Reichert Technologies) et un volume, contenant environ 3 millions de cellules, a été déposé dans un flasque T75 (Thermo Fisher

Scientific) ayant une surface de 75cm<sup>2</sup>. Les cellules ont été conservées dans un incubateur à 37 °C, à une concentration de 5% de CO<sub>2</sub>, avec une atmosphère humide. Tous les 2 à 3 jours, le milieu a été retiré du flasque et remplacé par un milieu de culture frais. Lorsque les cellules ont atteint un niveau de confluence de 80 %, elles ont été incubées avec une solution de Trypsine-EDTA 1X (Thermo Fisher Scientific) pendant 5 minutes, à 37 °C. Le surnageant a été recueilli du flasque et complété à un volume de 10 mL avec une solution de DMEM FBS 7%. Les cellules en suspension ont été dénombrées et déposées dans des plaques de 12 puits (P12, Thermo Fisher Scientific) contenant des lames de verre rondes (Thermo Fisher Scientific), des chambres à angiogenèse (Ibidi) et des boîtes de Pétri rondes (P100 Thermo Fisher Scientific).

### **2.3.2 Traitements avec des facteurs pro-fibrotiques**

Les fibroblastes des cœurs de rats normaux, les myofibroblastes des cœurs de rats CAS et les cellules endothéliales microvasculaires cardiaques ont été exposés à différents traitements pro-fibrotiques avant la fixation des cellules ou l'extraction des protéines. Les cellules ont été privées de FBS pour une durée de 48 heures et un traitement a été appliqué pour une durée de 24 heures. Les traitements pro-fibrotiques, soit Angiotensine II (AII, 10<sup>-6</sup> M, Sigma Aldrich), Transforming Growth Factor-β<sub>1</sub> (TGF- β<sub>1</sub>, 5 ng/mL, PeproTech) et Epidermal Growth Factor (EGF, 10ng/mL PeproTech) ont été dissous dans le DMEM et ont été ajoutés aux puits des P12 et aux P100, après deux lavages effectués avec le DMEM.

### **2.3.3 Fixation des cellules en cultures**

Les P12 contenant les lames de verre rondes, sur lesquelles repose une couche de cellules, ont été lavées à 3 reprises avec une solution de PBS 1X. Ensuite, les lames ont été incubées dans une solution de paraformaldéhyde 2%, pendant 20 min, à la température de la pièce. Les lames ont été lavées 3 fois avec une solution de PBS 1X, puis elles ont été conservées dans une solution de PBS1X / Glycérol dans un congélateur à -80°C.

### **2.3.4 Immunofluorescence des cellules en culture**

La procédure d'immunofluorescence sur les cellules est la même procédure qui a été décrite à la page 55, dans la section 2.2.5 : *Immunofluorescence et microscopie confocale sur tissus conservés dans le 2-Méthylbutane*. Par contre, les concentrations de Triton X-100 et de NGS/NDS, dans les solutions de blocage et d'anticorps, diffèrent. La solution de blocage est composée de 0,2% de Triton X-100 et de 2% de NGS/NDS, tandis que la solution contenant les anticorps est composée de 0,05% de Triton X-100 et de 1% de NGS/NDS (voir le Tableau 2.1 pour les concentrations d'anticorps utilisées).

### **2.3.5 Essai sur Matrigel**

Le Matrigel (BD Science) a été préalablement décongelé à 4°C pendant la nuit précédant l'expérience. Une quantité de 10 µL de Matrigel a été déposée dans les 15 puits de la chambre à angiogenèse afin d'éviter la formation d'un ménisque. La chambre a été placée dans un incubateur, à 37 °C, pour permettre au Matrigel de polymériser. Les fibroblastes des cœurs normaux et les myofibroblastes des cœurs CAS, mis en suspension dans une solution de DMEM contenant 7% de FBS, ont été apposés dans les puits pour un ratio de 10 000 cellules par puits, couvrant une aire totale de 12,56mm. La chambre a été incubée à 37 °C pour une durée de 6 heures. Des photos ont été prises à chaque heure avec une magnification de 10X sur l'interface d'ImagePro. À la fin de l'incubation, les cellules ont été fixées selon la procédure décrite dans la section 3.3.2 : *Fixation des cellules en cultures*.

### **2.3.6 Extraction de protéines à partir de cellules**

Les boîtes de Pétri rondes P100, contenant les cellules, ont été lavées à deux reprises avec une solution froide de PBS 1X. Ensuite, un tampon de lyse a été ajouté aux pétris et ceux-ci ont été déposés sur glace pour une période de 45 minutes. Après cette période, les cellules ont été recueillies, en grattant la surface des P100. Les cellules, en solution, ont été placées à l'intérieur de microtubes qui ont été centrifugés, à 10 000 RPM, pour une durée de 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été recueilli pour chaque condition et la concentration de chaque échantillon a été mesurée selon la méthode de Bradford. Les échantillons ont été utilisés pour

des techniques d'immunobuvardage de type Western telles que décrites dans la section 3.2.8 : *Immunobuvardage de type Western*.

## **2.4 Analyse statistique**

Les données présentées dans ce mémoire ont été évaluées par une analyse de variance de type one-way ANOVA avec les programmes GraphPad InStat et Prism. La différence significative a été déterminée par le test post-hoc de comparaisons multiples Student Newman-Keuls ou par un test-T bilatéral non-pairé de Student. Seules les valeurs de  $P < 0.05$  sont considérées statistiquement différentes. Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne  $\pm$  S.E.M. Le symbole  $n$  représente le nombre de rats dans les expériences de nature *In Vivo*, alors qu'il représente le nombre de préparation cellulaire dans les expériences de nature *In Vitro*.

## **CHAPITRE 3 : RÉSULTATS**



## **Le profil hémodynamique et le remodelage cardiaque des rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale**

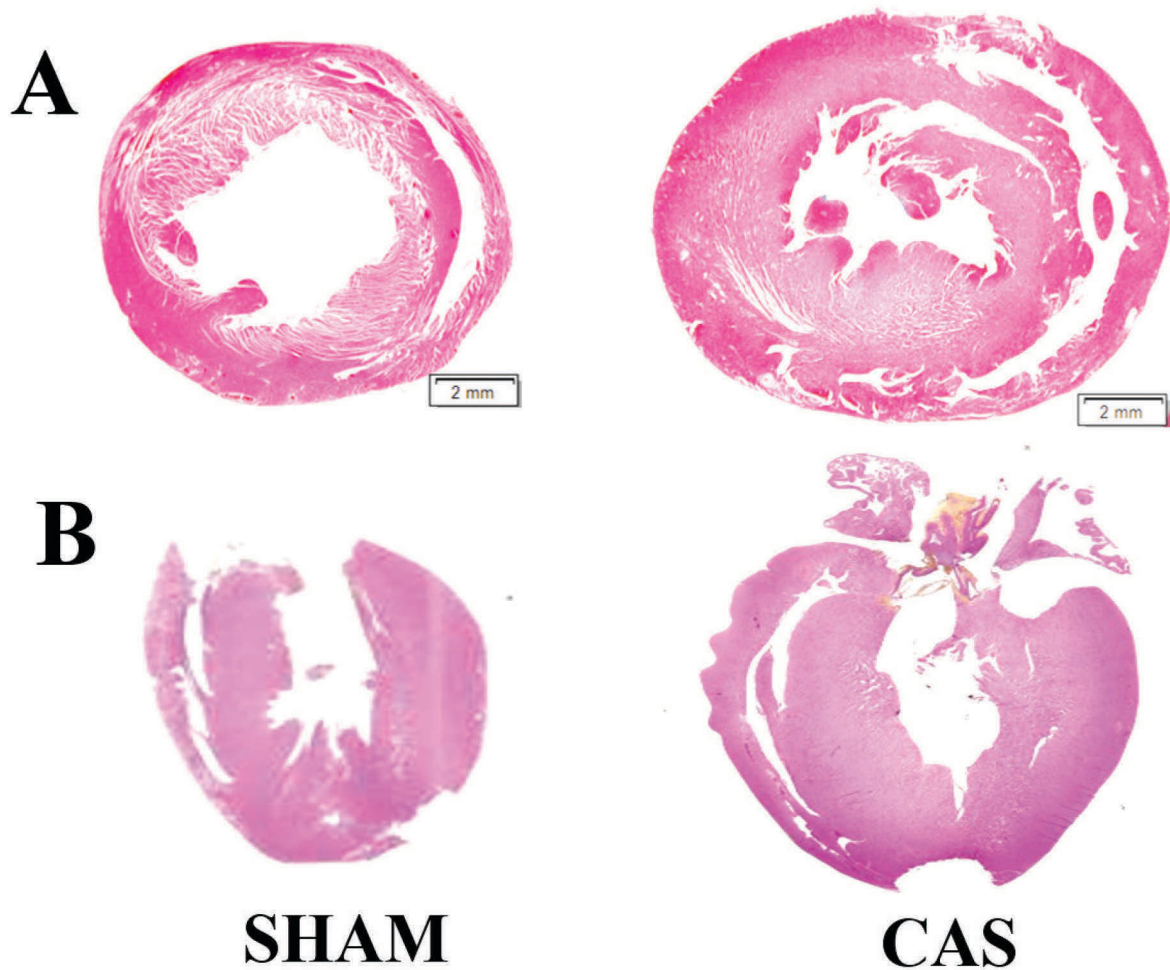
Afin d'étudier le processus de fibrose réactive cardiaque, notre laboratoire a mis au point une technique de constriction aortique supra-rénale (CAS) qui mène au développement de l'hypertension artérielle et de l'hypertrophie concentrique (144). Dans un premier temps, nous avons caractérisé notre modèle animal en comparant les mesures hémodynamiques, les paramètres morphologiques et la quantification de collagène cardiaque entre les groupes de rats sham et de rats CAS. Deux semaines suivant la CAS chez les rats adultes Sprague-Dawley, nous observons une augmentation significative de la pression artérielle systolique (PAS), de la pression artérielle diastolique (PAD), de la pression artérielle moyenne (PAM), de la pression systolique du ventricule gauche (PSVG), alors que la fréquence cardiaque et la pression diastolique du ventricule gauche (PDVG) demeurent inchangées (tableau 3.1). Au niveau de la morphologie, une augmentation significative du poids du cœur (PC), du poids des ventricules normalisés avec le poids des rats (VG/PR et VD/PR) et une augmentation de l'épaisseur du ventricule gauche indiquent un patron d'hypertrophie concentrique chez les rats CAS (tableau 3.2, figure 3.1 et figure 3.2) (145). L'hypertrophie cardiaque concentrique secondaire à la CAS est associée avec une fibrose réactive importante au niveau interstitiel et péri-vasculaire qui est caractérisée par la déposition élevée de collagène (figure 3.3 et figure 3.4) (146).

	Fréquence cardiaque, bpm	PAS, mmHg	PAD, mmHg	PAM, mmHg	PSVG, mmHg	PDVG, mmHg	+dP/dT, mmHg/s	-dP/dT, mmHg/s
Sham (n= 6-8)	280 ± 7	116 ± 3	90 ± 3	98 ± 2	120 ± 4	2.3 ± 0.7	5,843 ± 168	4,724 ± 156
CAS (n= 6-8)	273 ± 13	186 ± 14*	109 ± 3*	134 ± 6*	192 ± 20*	1.5 ± 0.3	7,617 ± 421*	7,747 ± 810*

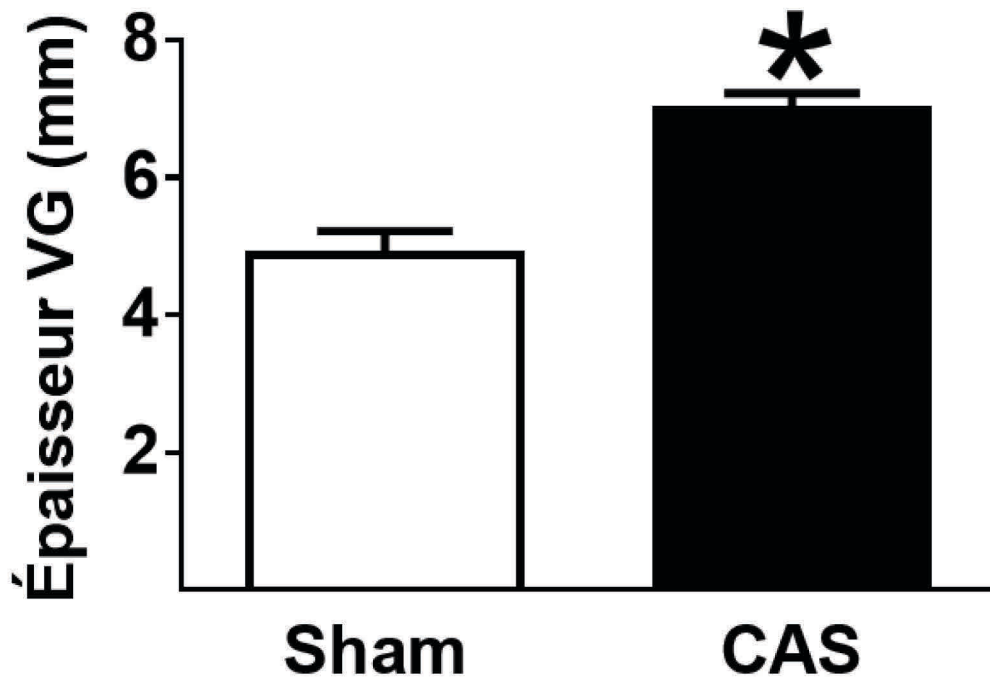
**Tableau 3.1 : Valeurs hémodynamiques des rats sham et des rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** PAS, signifie pression artérielle systolique ; PAD, signifie pression artérielle diastolique ; PAM, signifie pression artérielle moyenne ; PSVG, signifie pression systolique du ventricule gauche ; PDVG, signifie pression diastolique du ventricule gauche ; +dP/dT, signifie dérivé première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (vitesse de contraction) ; -dP/dT, signifie dérivé première de la pression du ventricule gauche en fonction du temps (vitesse de relaxation). Les données sont représentées par la moyenne ± S.E.M, analysées avec un test Student non-pairé ; (\*), signifie p< 0.05 versus sham et (n), nombre de rats examinés.

	PR, g	PC, g	VG, mg	VG/PR, mg/g	VD, g	VD/PR, mg/g
Sham (n= 8)	406 ± 8	1.28 ± 0.09	591 ± 40	1.46± 0.1	231 ± 16	0.57 ± 0.04
CAS (n= 8)	396 ± 8	1.56 ± 0.07*	802 ± 49*	2.03± 0.1*	284 ± 9*	0.72 ± 0.02*

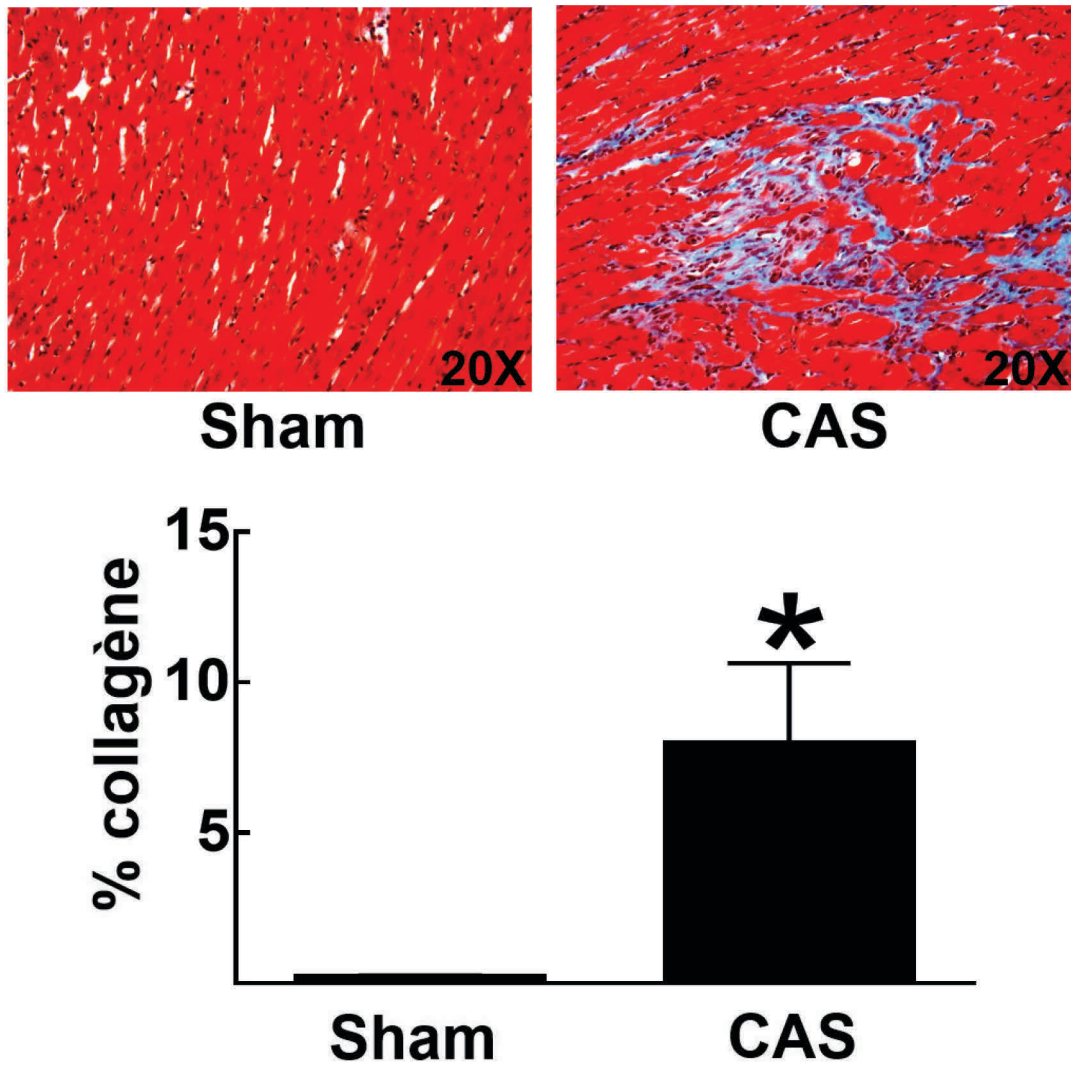
**Tableau 3.2: Poids des rats sham et des rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** PR, signifie poids du rat ; PC, signifie poids du cœur de rat ; VG, signifie poids du ventricule gauche ; VD, signifie poids du ventricule droit. Les données sont représentées par la moyenne ± S.E.M, analysées avec un test Student non-pairé, (\*), signifie P< 0.05 versus sham et (n), nombre de rats examinés



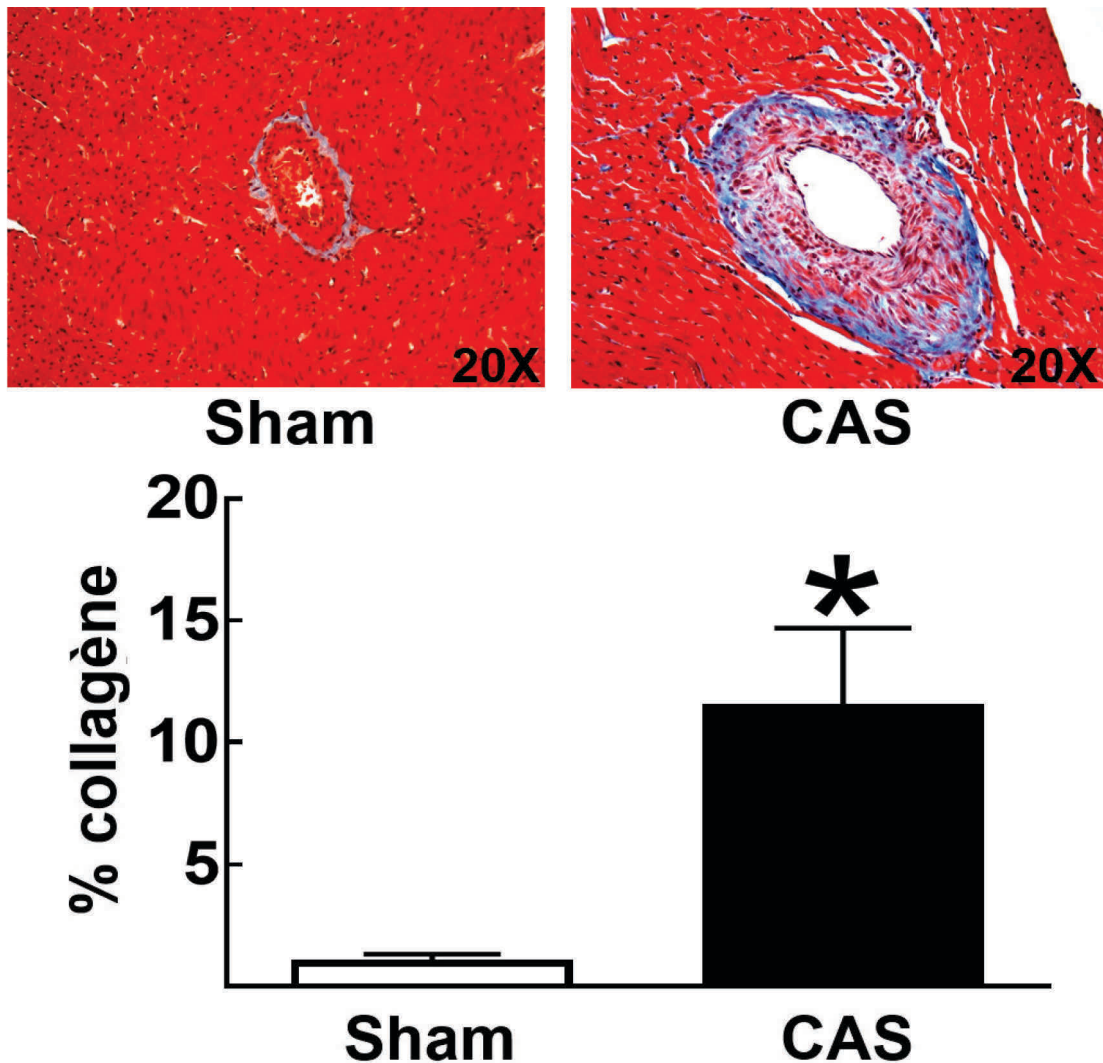
**Figure 3.1 : La constriction aortique supra-rénale (CAS) mène à l’hypertrophie du ventricule gauche après deux semaines chez le rat. A) Coupes transversales d’un cœur sham et d’un cœur CAS colorés au HPS. B) Coupes longitudinales d’un cœur sham et d’un cœur CAS colorés au HPS.**



**Figure 3.2 : La constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines provoque un épaissement du ventricule gauche. L'épaisseur de la paroi du ventricule gauche est significativement augmentée dans les cœurs de rats CAS, en comparaison avec l'épaisseur du ventricule gauche dans les cœurs de rats sham. (\*), signifie  $P < 0.05$  versus sham,  $n=3$ .**



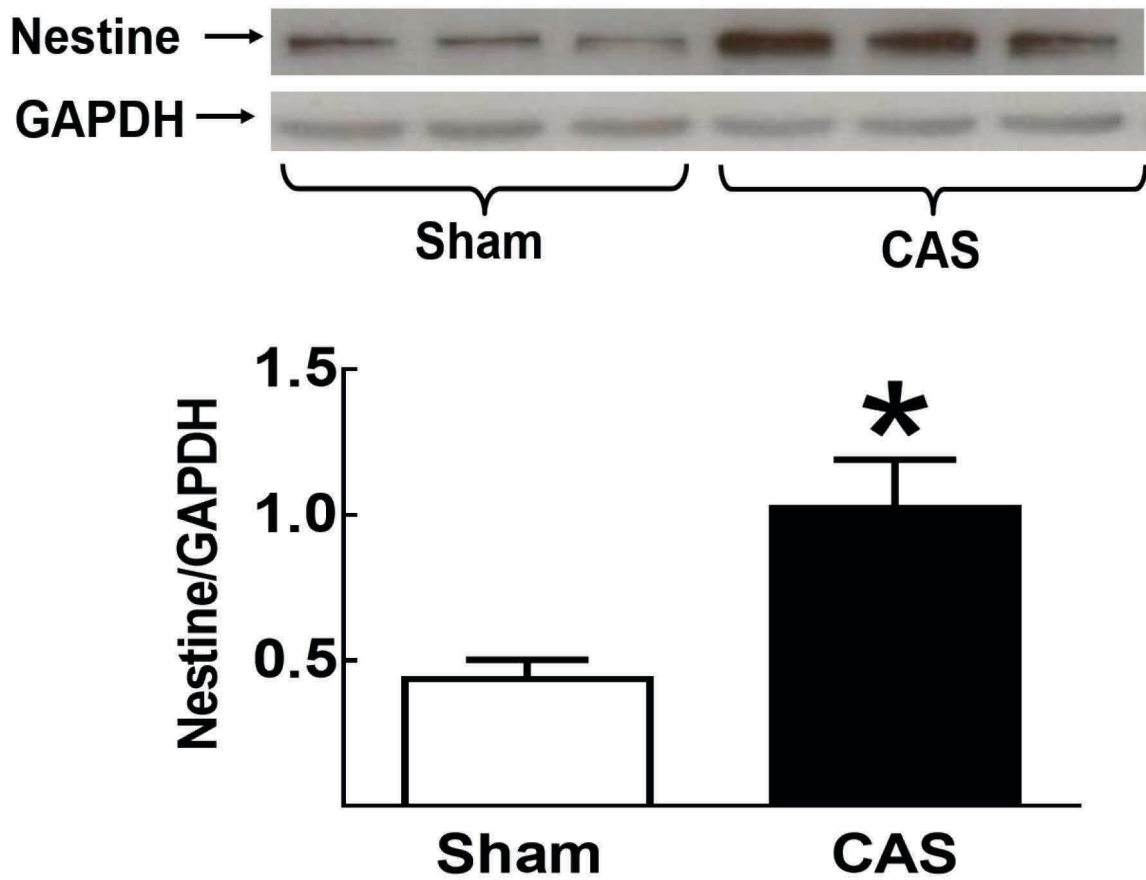
**Figure 3.3 : La constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines provoque une fibrose réactive dans la région interstitielle du ventricule gauche chez le rat.** Le collagène est significativement augmenté dans la région interstitielle du ventricule gauche des cœurs de rats CAS, comparativement au ventricule gauche des cœurs de rats sham. La déposition de collagène (en bleu) est visible grâce à une coloration au trichrome de Masson. La valeur de l'aire du collagène mesurée a été normalisée avec l'aire du tissu total visible dans le champ. Cette valeur a ensuite été multipliée par un facteur de 100. (\*), signifie  $P < 0.05$  versus sham,  $n=3$ .



**Figure 3.4 : La constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines provoque la fibrose réactive dans la région péri-vasculaire après deux semaines chez le rat. Le collagène est significativement augmenté dans la région péri-vasculaire des vaisseaux sanguins des cœurs de rats CAS, comparativement aux cœurs de rats sham. La déposition de collagène (en bleu) est visible grâce à une coloration au trichrome de Masson. La valeur de l'aire du collagène mesurée a été normalisée avec l'aire du tissu total visible dans le champ. Cette valeur a ensuite été multipliée par un facteur de 100. (\*), signifie  $P < 0.05$  versus Sham,  $n=3$ .**

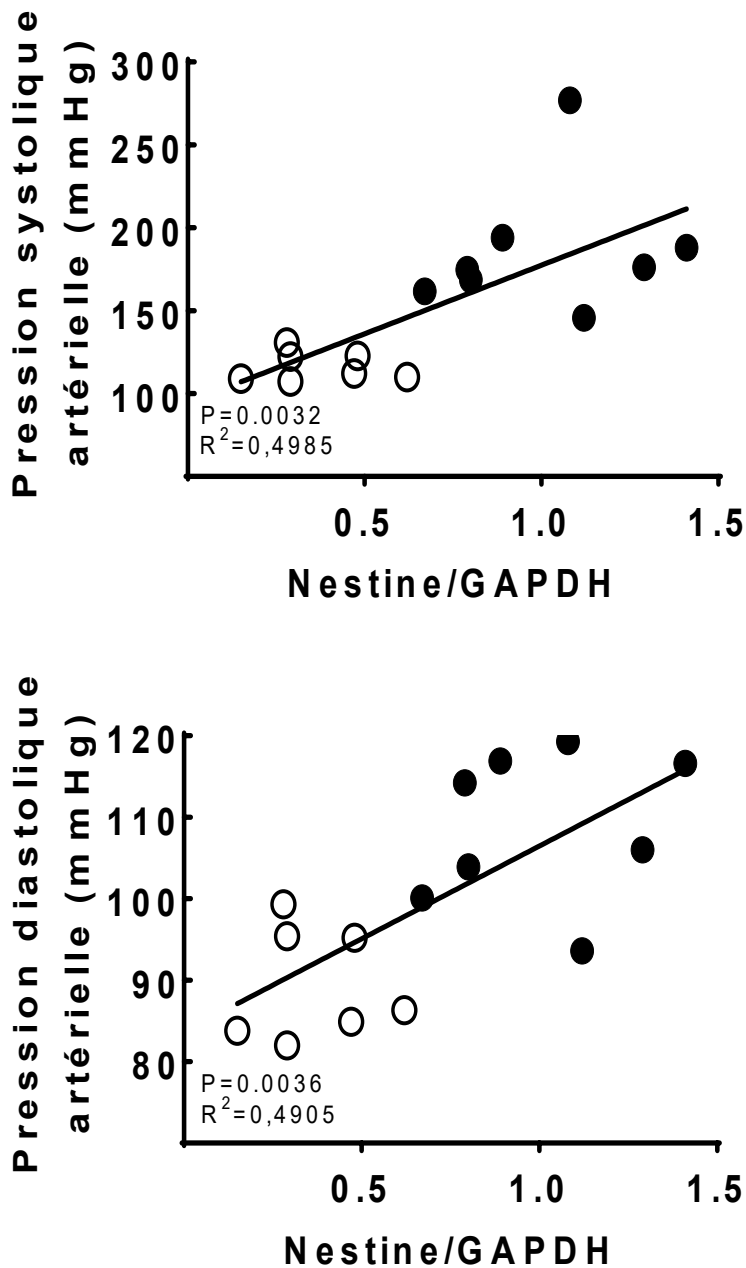
## **L'expression de la protéine nestine dans les cœurs des rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale**

L'expression de la protéine nestine est augmentée de manière significative dans les cœurs dans de rats CAS, comparativement aux cœurs de rats sham (figure 3.5). Nous avons procédé à des tests statistiques afin de déterminer si l'expression de nestine est partiellement dépendante de la fonction cardiaque. Nous observons une corrélation positive entre l'expression de nestine et la pression systolique artérielle (PAS), la pression diastolique artérielle (PAD), la pression artérielle moyenne (MAP), et la pression systolique du ventricule gauche (LVSP) (figure 3.6, figure 3.7 et figure 3.8). Ces corrélations peuvent expliquer la variation de l'expression de nestine en fonction de la sévérité de la procédure de CAS.

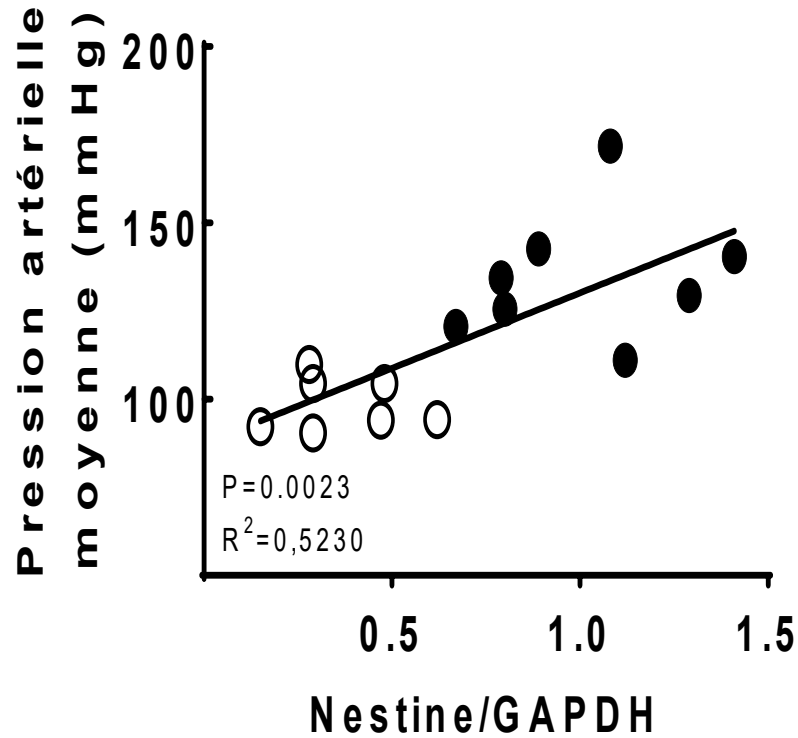


**Figure 3.5 : L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les cœurs de rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines. A) L'expression de la protéine nestine est augmentée significativement dans les cœurs de rats CAS. B) Représentation graphique de l'expression de la protéine nestine normalisée avec la protéine GAPDH. (\*), signifie  $P < 0.05$  versus sham,  $n=8$ .**

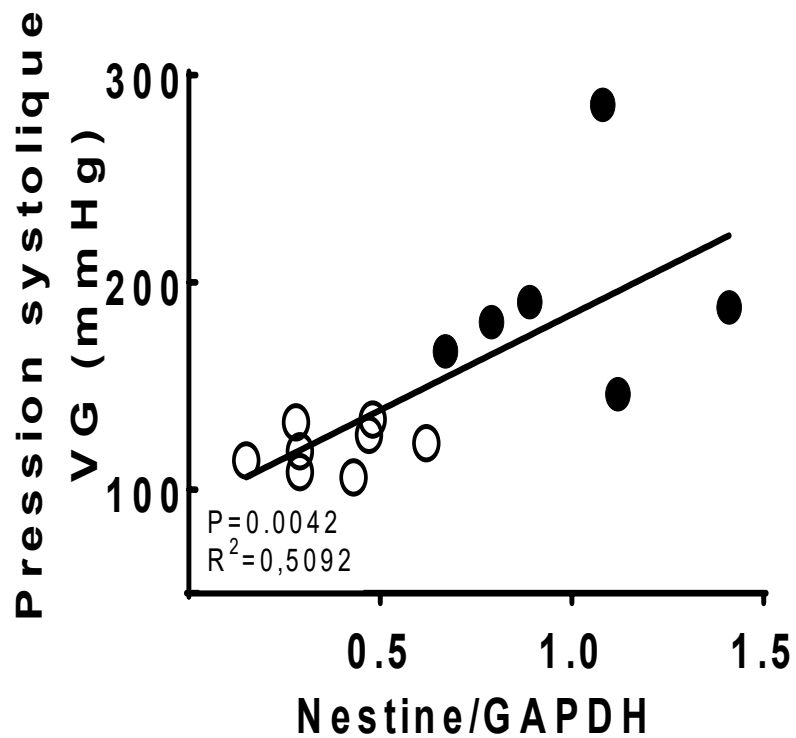




**Figure 3.6 : Corrélation de l'expression nestine avec la pression systolique artérielle et la pression diastolique artérielle.** L'expression de la protéine nestine dans les cœurs de rats corrèle avec la pression systolique artérielle et la pression diastolique artérielle des rats. Les cercles ouverts représentent les rats sham, alors que les cercles fermés représentent les rats CAS. L'expression de la protéine nestine a été normalisée avec GAPDH, n=7-8.



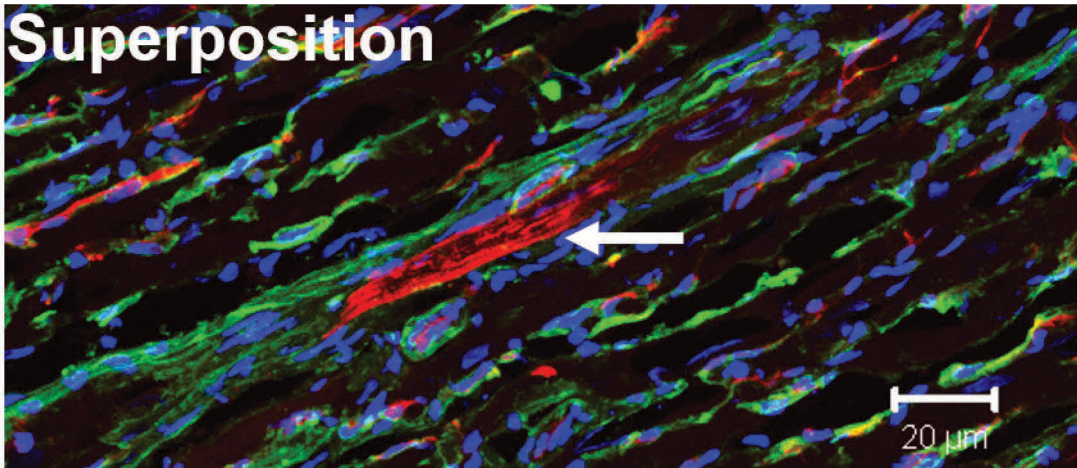
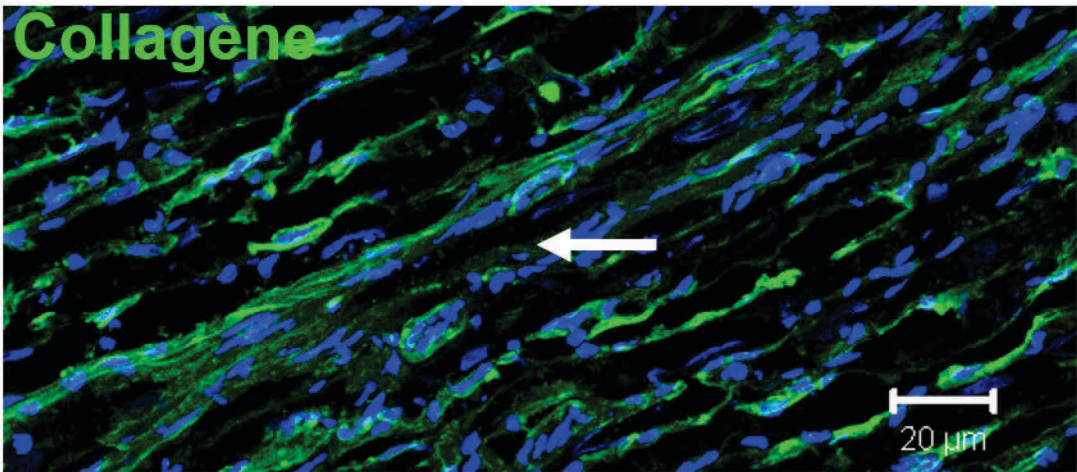
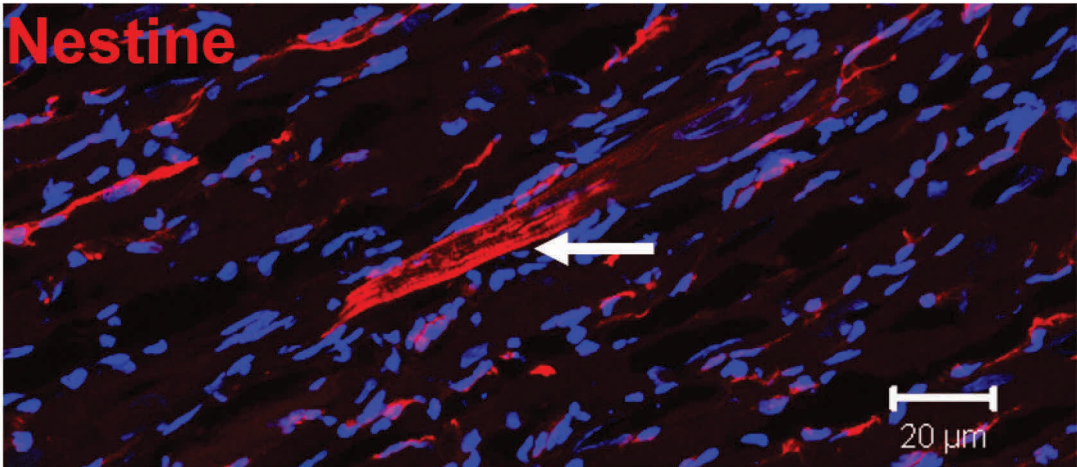
**Figure 3.7 : Corrélation de l'expression nestine avec la pression artérielle moyenne.** L'expression de la protéine nestine dans les cœurs de rats corrèle avec la pression systolique artérielle moyenne des rats. Les cercles ouverts représentent les rats sham, alors que les cercles fermés représentent les rats CAS. L'expression de la protéine nestine a été normalisée avec GAPDH, n=7-8.

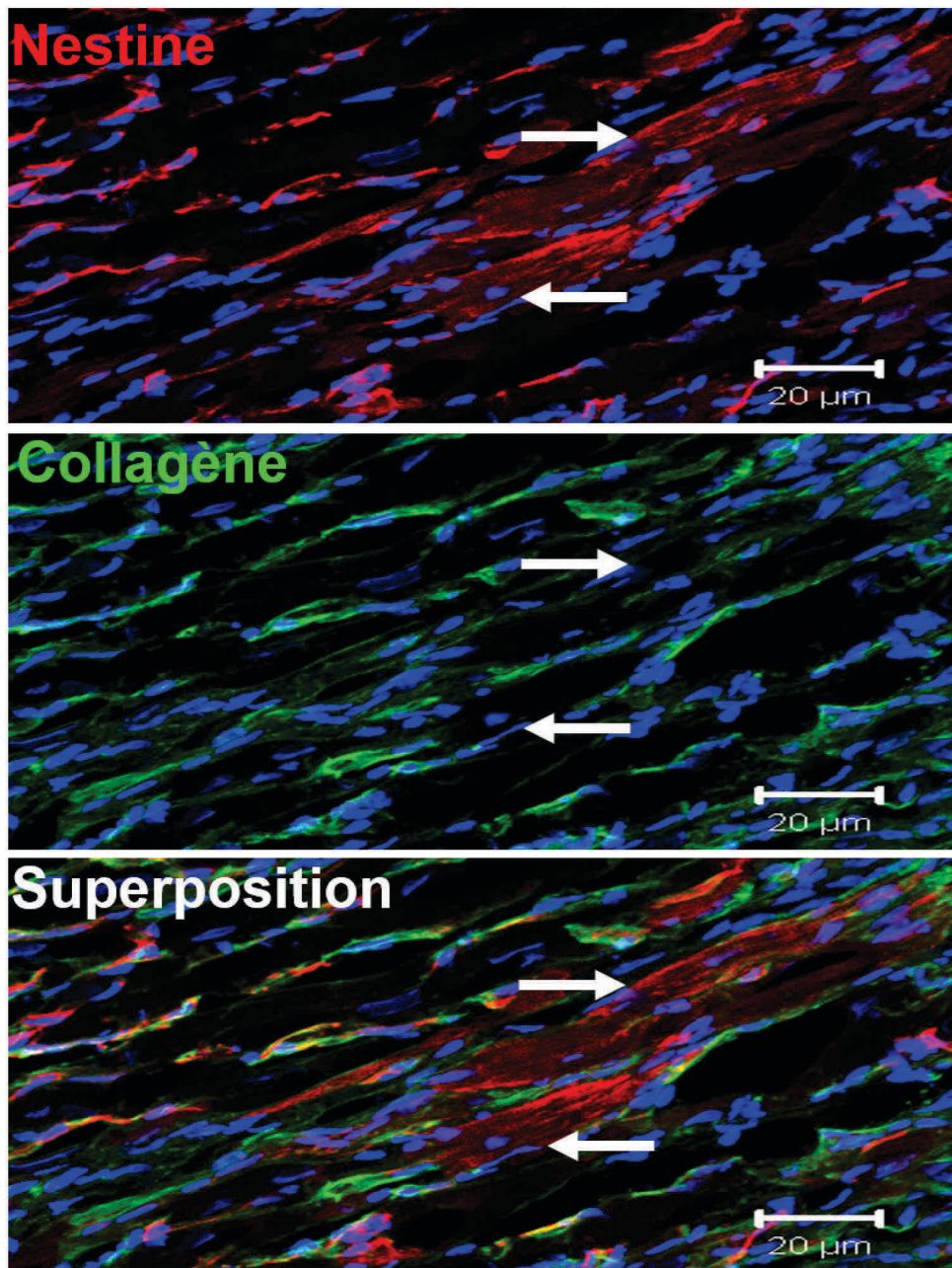


**Figure 3.8 : Corrélation de l'expression nestine avec la pression systolique dans le ventricule gauche.** L'expression de la protéine nestine dans les cœurs de rats corrèle avec la pression systolique dans le ventricule gauche des rats. Les cercles ouverts représentent les rats sham, alors que les cercles fermés représentent les rats CAS. L'expression de la protéine nestine a été normalisée avec GAPDH, n=7-8.

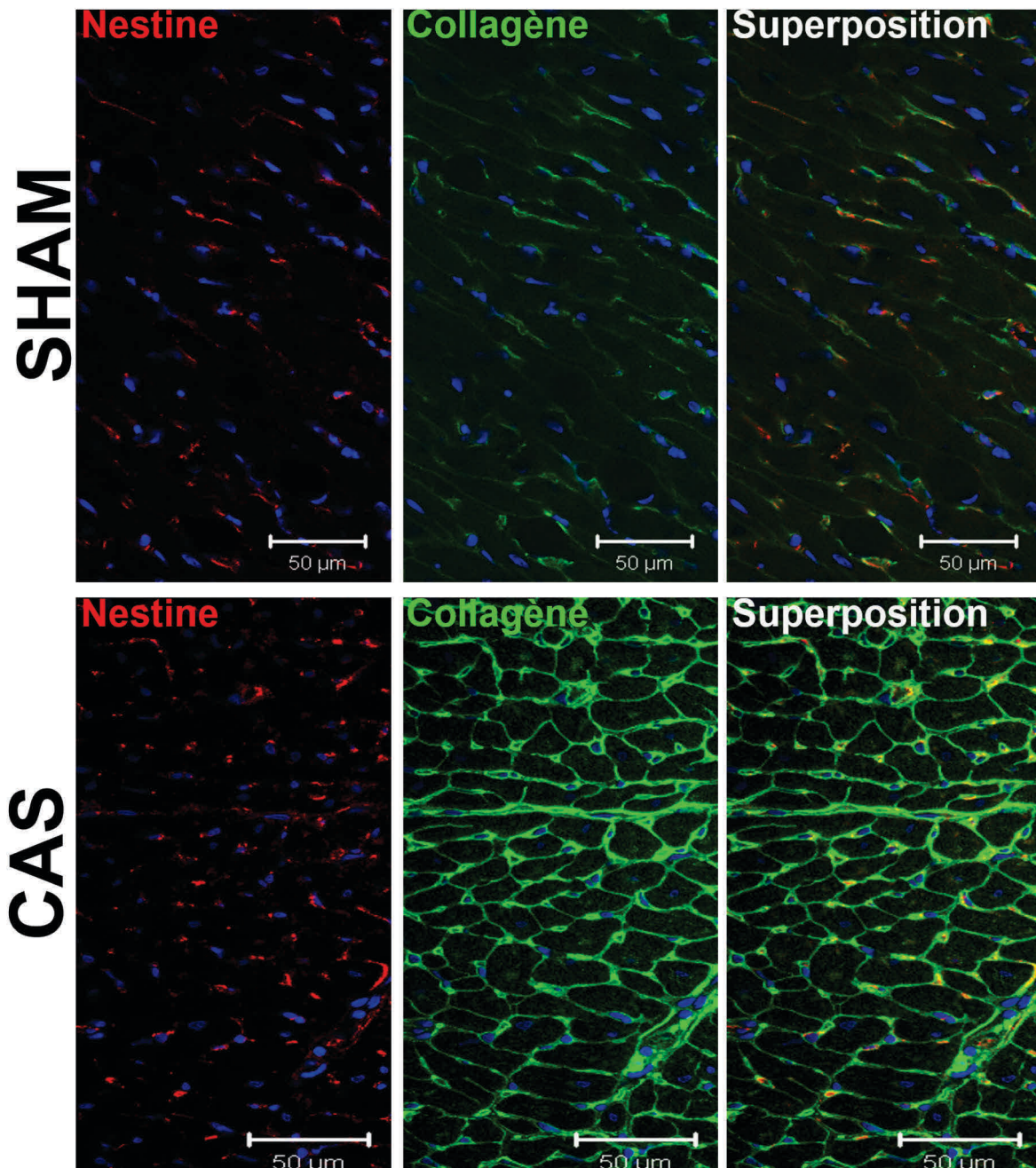
## **La distribution de la protéine nestine dans les différents types cellulaires du cœur suivant une constriction aortique supra-rénale**

Les résultats précédents établissent l'augmentation de la protéine nestine dans les cœurs de rats ayant subi une CAS de deux semaines. De plus, il est démontré dans la littérature scientifique que la protéine nestine peut être exprimée dans différents types cellulaires tels que les cardiomyocytes et les fibroblastes (101). Nous avons donc procédé aux techniques d'immunofluorescence afin d'avoir une analyse qualitative de l'augmentation de la protéine nestine. Suite à une CAS de deux semaines, une sous-population de cardiomyocytes exprime la protéine nestine (figure 3.9). De plus, une population de cellules mésenchymateuses qui expriment collagène  $\alpha_1$  et nestine est principalement observée dans la zone interstitielle du ventricule gauche des cœurs de rats sham. Cette population de cellules mésenchymateuses qui expriment collagène  $\alpha_1$  et nestine est augmentée dans le ventricule des cœurs de rats hypertrophiés de façon importante. En contraste avec les cœurs de rats sham, nous observons cette population de cellules mésenchymateuses dans la zone péri-vasculaire des vaisseaux sanguins dans les cœurs de rats CAS (figure 3.10 et figure 3.11). Ce patron d'expression est aussi récurrent pour la co-expression de nestine et CD31. Ainsi, une faible fraction de cellules endothéliales déplacées CD31<sup>(+)</sup> exprime la protéine nestine dans les cœurs de rats sham, alors que ces cellules sont nettement plus visibles dans les cœurs de rats CAS (figure 3.12 et figure 3.13). Dans les cœurs de rats sham et de rats CAS, l' $\alpha$ -SMA ne co-exprime pas avec la protéine nestine dans la région interstitielle et péri-vasculaire. La présence de l' $\alpha$ -SMA est détectée dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (figure 3.14).

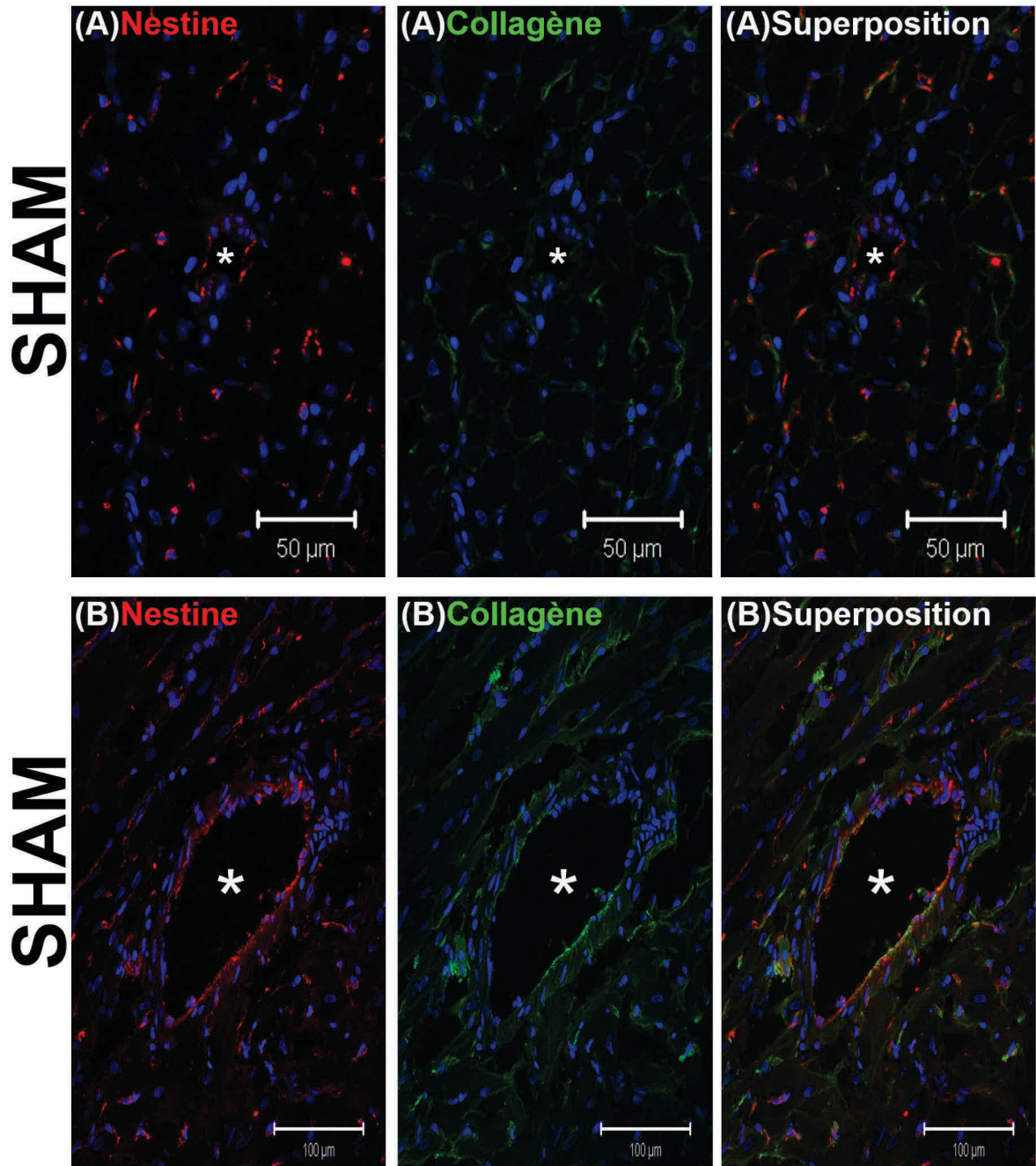




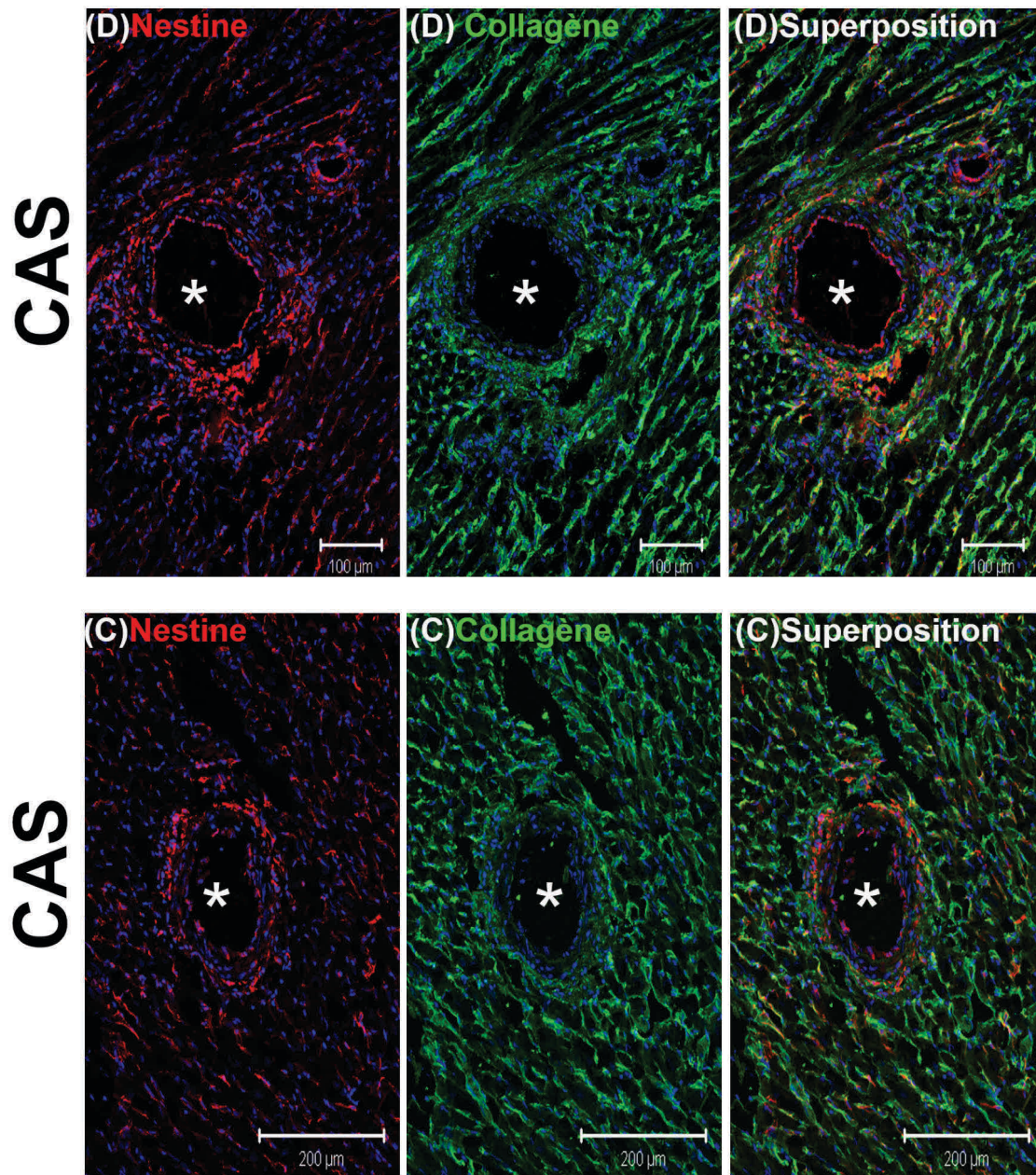
**Figure 3.9 : Présence de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> dans les cœurs de rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** Une sous-population de cardiomyocytes exprime la protéine nestine (fluorescence rouge), sous la forme d'un patron strié, dans le ventricule gauche des cœurs de rats CAS. Les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> sont négatifs à l'expression de collagène  $\alpha_1$  (fluorescence verte). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).



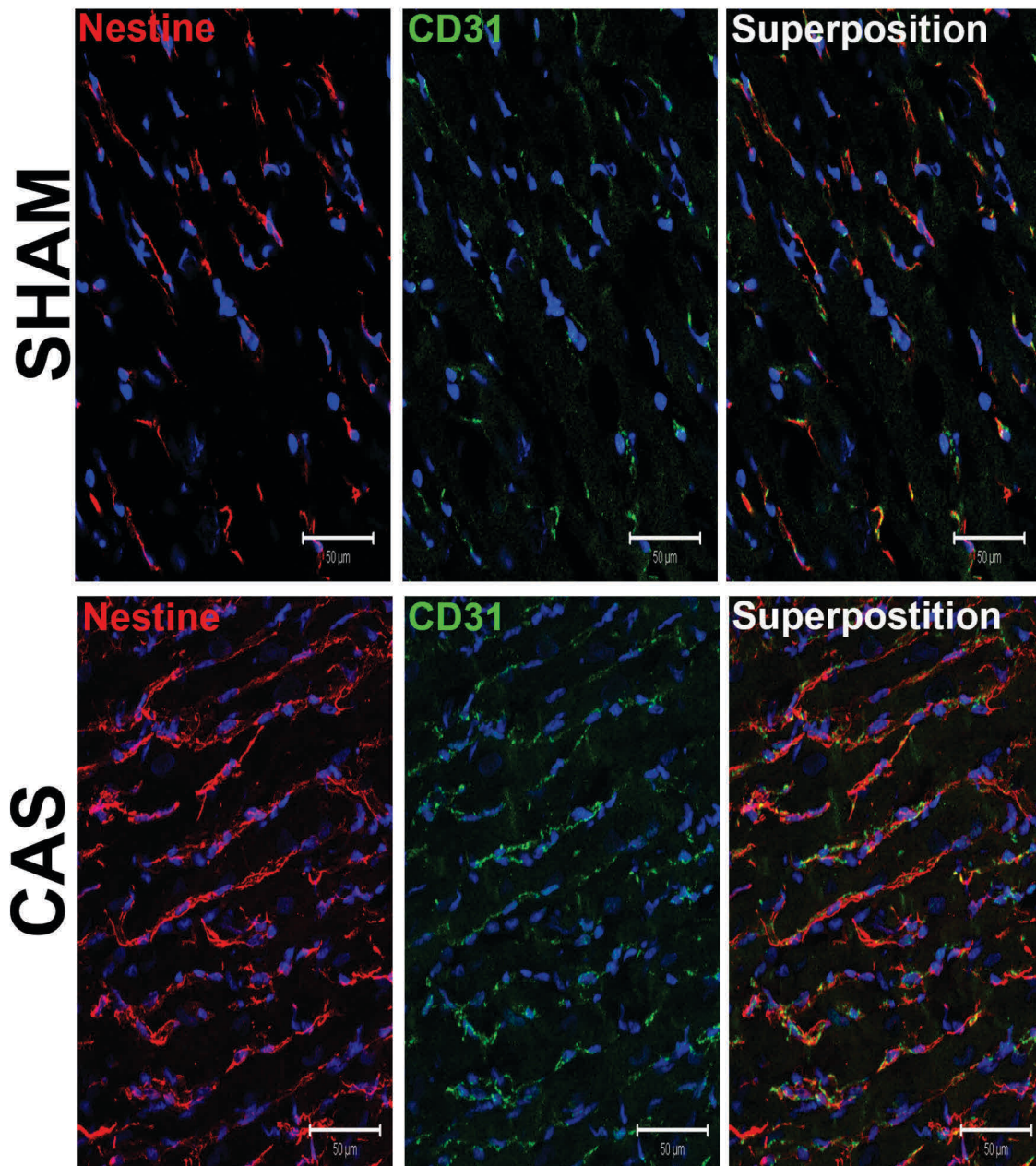
**Figure 3.10 : Présence de cellules mésenchymateuses nestine<sup>(+)</sup> dans les cœurs de rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines. Il y a une augmentation des cellules mésenchymateuses qui co-expriment la protéine nestine (fluorescence rouge) et collagène  $\alpha_1$  (fluorescence verte) dans la région interstitielle du ventricule gauche des cœurs de rats CAS (B), comparativement au ventricule gauche des cœurs de rats sham (A). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).**



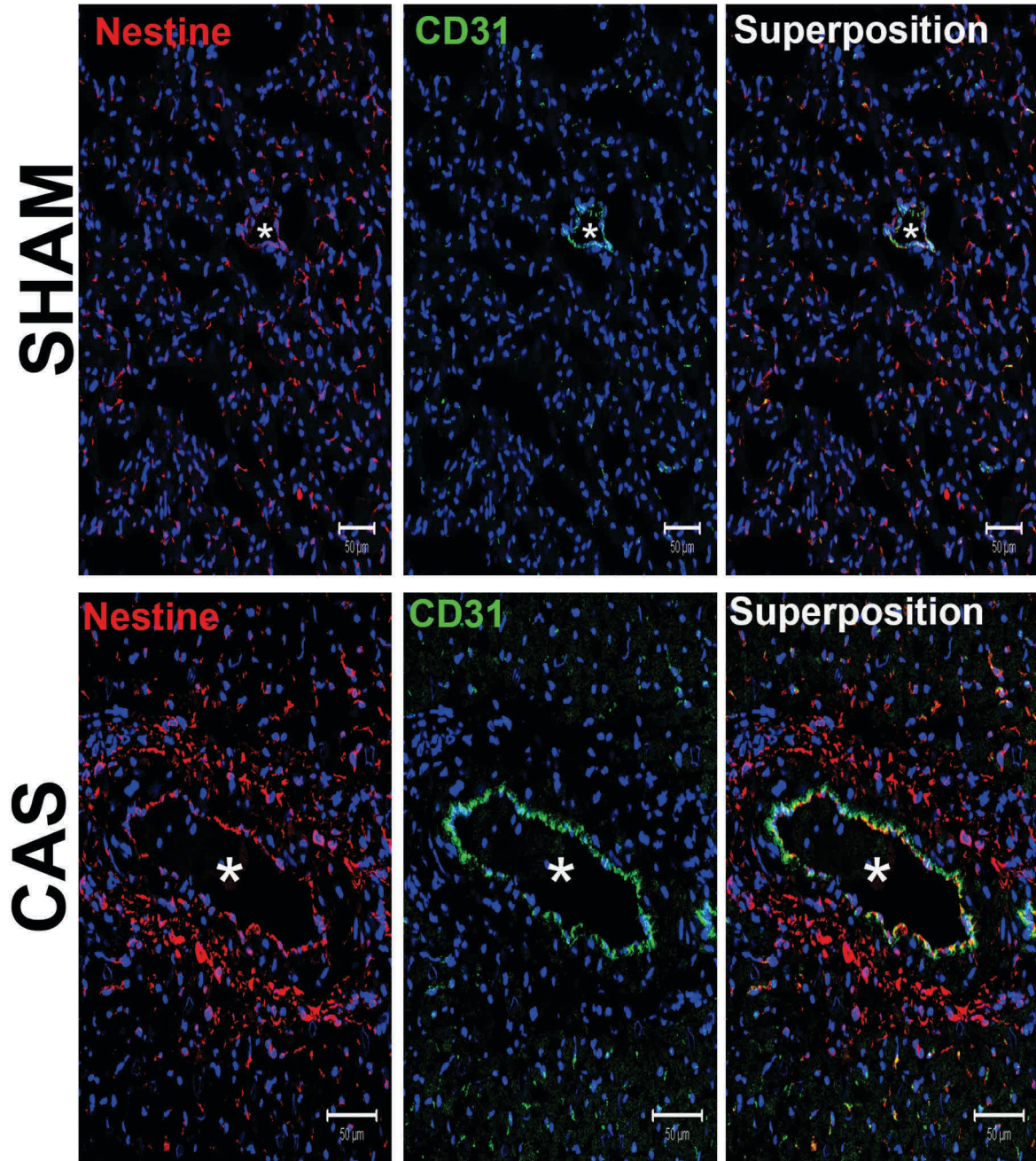




**Figure 3.11 : Présence de cellules mésenchymateuses nestine<sup>(+)</sup> dans les cœurs de rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** Il y a une augmentation de cellules mésenchymateuses qui co-expriment la protéine nestine (fluorescence rouge) et collagène  $\alpha_1$  (fluorescence verte) dans la région péri-vasculaire des vaisseaux du cœur chez les rats CAS (C et D), comparativement aux rats sham (A et B). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue). Les vaisseaux sanguins sont représentés par le symbole (\*).

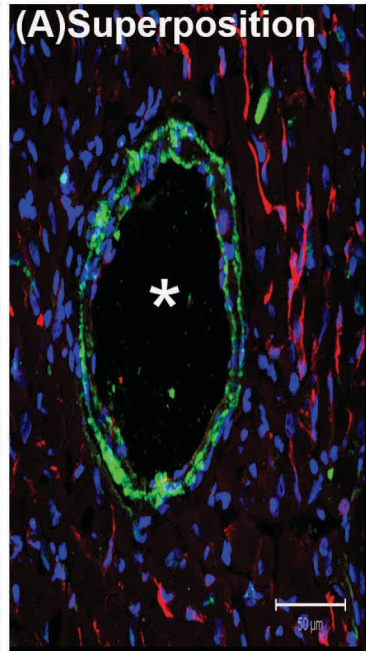
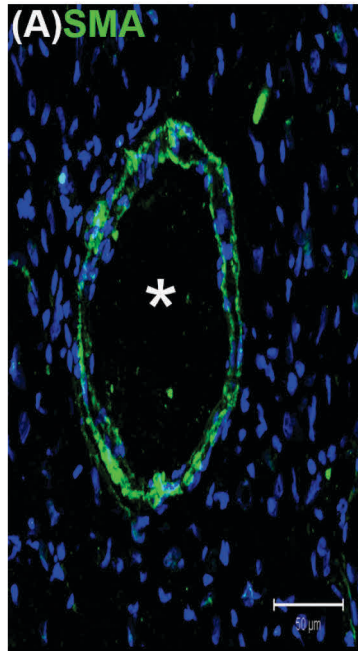
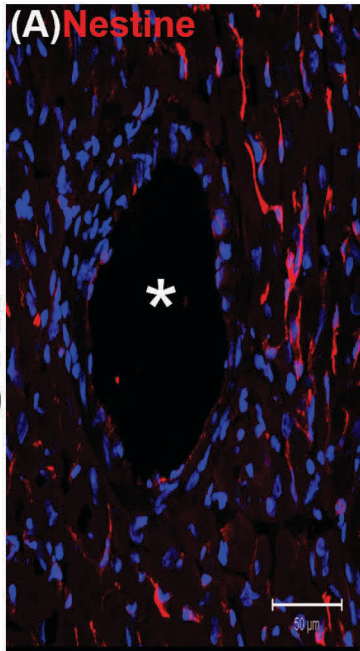


**Figure 3.12 : Augmentation des cellules co-exprimant nestine et CD31 dans les cœurs de rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** Il y a une augmentation des cellules qui co-expriment CD31 (fluorescence verte) et la protéine nestine (fluorescence rouge) dans le ventricule gauche des cœurs de rats CAS (B), comparativement aux cœurs de rats sham (A). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).

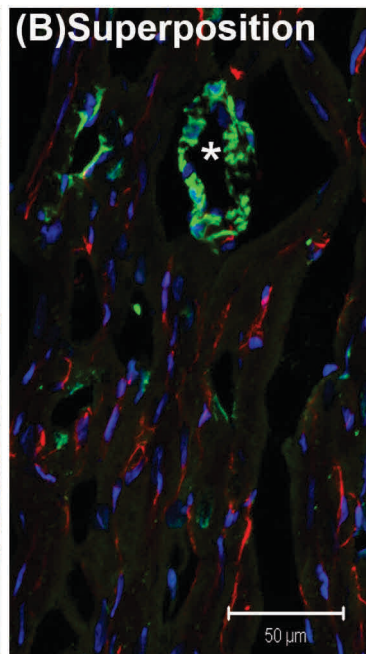
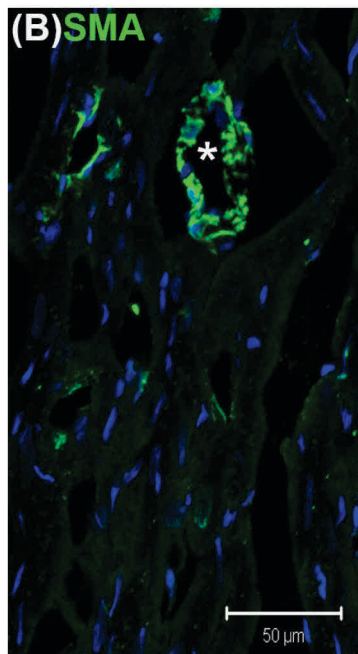
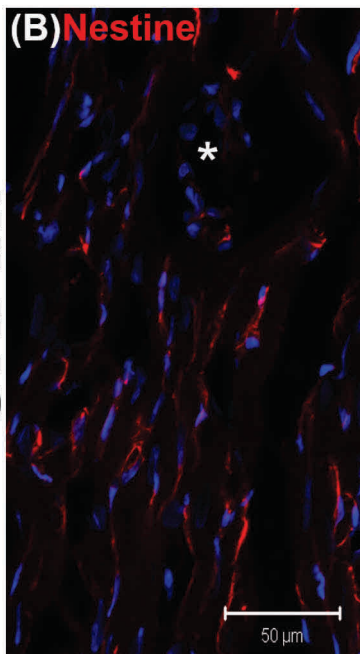


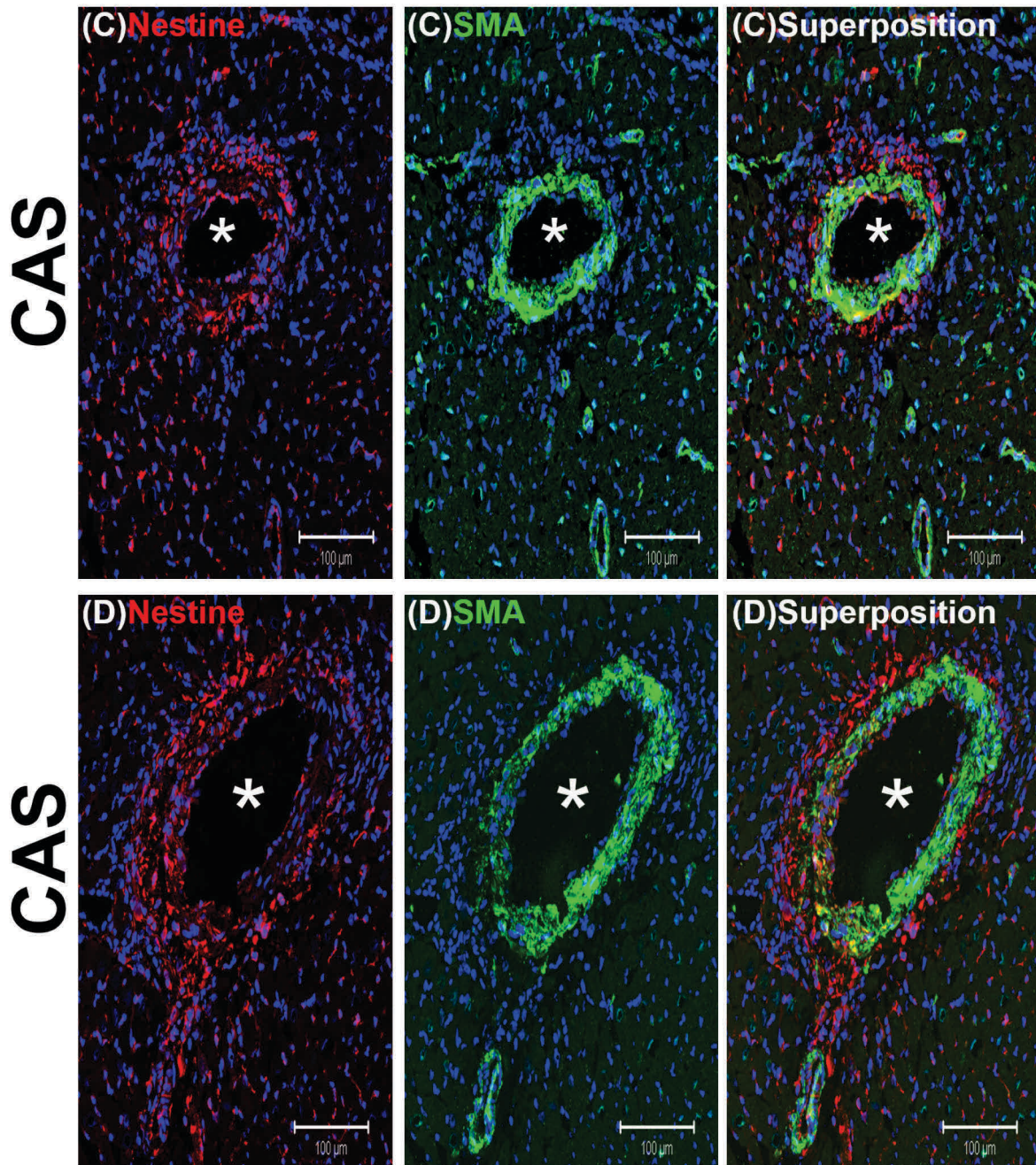
**Figure 3.13 : Augmentation des cellules co-exprimant nestine et CD31 dans les cœurs de rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** Il y a une augmentation des cellules qui co-expriment CD31 (fluorescence verte) avec la protéine nestine (fluorescence rouge) dans la région péri-vasculaire des cœurs de rats CAS (B), comparativement aux cœurs de rats sham (A). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue). Les vaisseaux sanguins sont représentés par le symbole (\*).

SHAM



SHAM





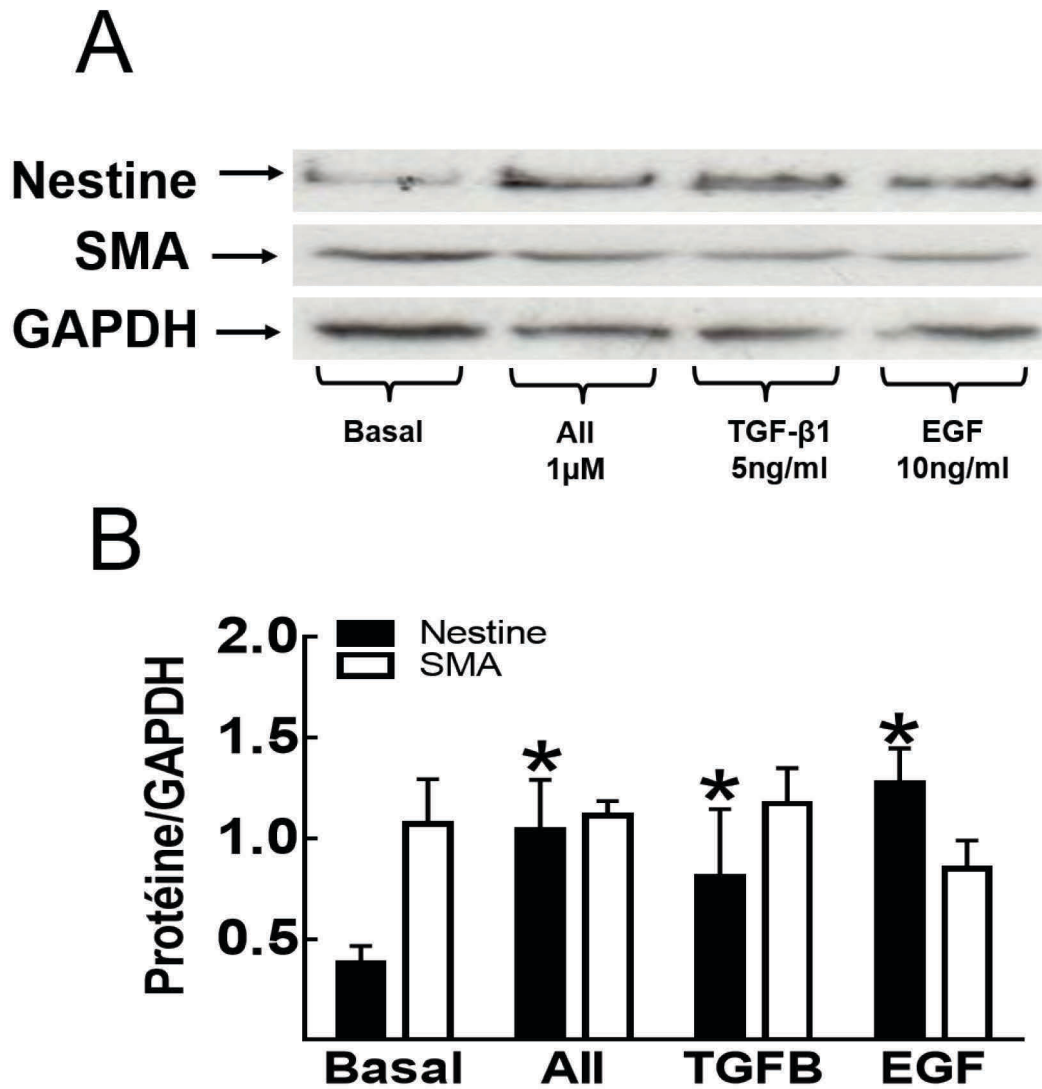
**Figure 3.14 : Absence de la protéine nestine dans les cellules musculaires lisses vasculaires.** La protéine nestine ne co-localise pas avec l' $\alpha$ -SMA dans les cellules musculaires lisses vasculaires des vaisseaux sanguins des cœurs de rats sham (A et B) et des cœurs de rats CAS (C et D). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue). Les vaisseaux sanguins sont représentés par le symbole (\*).

## **L'expression de la protéine nestine dans les fibroblastes et son induction par des facteurs de croissance**

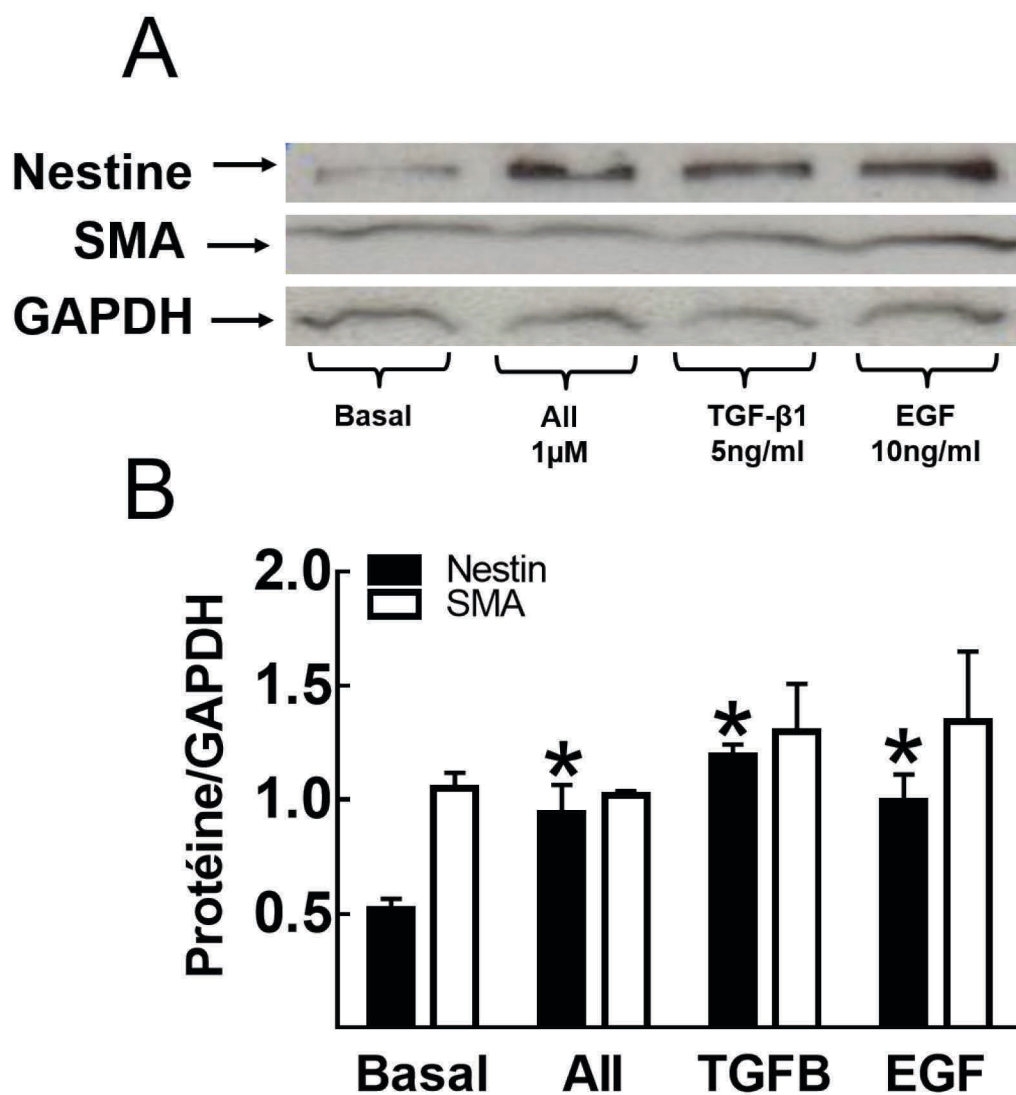
La co-expression de la protéine nestine et de collagène  $\alpha_1$  dans une population de cellules supporte la présence de cellules ayant un phénotype mésenchymateux dans les cœurs de rats sham et de rats CAS. Sur la base de ces observations, nous avons testé l'hypothèse que les fibroblastes résidents du ventricule expriment la protéine nestine et que son expression est augmentée en réponse aux stimuli pro-fibrotiques qui sont impliqués dans la fibrose réactive.

Les fibroblastes isolés du ventricule gauche des cœurs de rats sham et de cœurs de rats CAS expriment les marqueurs  $\alpha$ -SMA et collagène  $\alpha_1$ , ce qui confirme le phénotype des cellules que nous avons isolées (figure 3.15, 3.16 et 3.17). L'expression de la protéine nestine est significativement augmentée dans les fibroblastes isolés du ventricule de rats sham et CAS exposés à un traitement de 24 heures avec AII ( $10^{-6}$ M), TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) et EGF (10ng/mL), comparativement aux fibroblastes non-traités. L'expression de l' $\alpha$ -SMA dans les fibroblastes isolés demeure inchangée suite au traitement avec les facteurs pro-fibrotiques (figure 3.15 et 3.16).

Afin de vérifier le phénotype filamenteux de la protéine nestine dans les fibroblastes exposés aux facteurs pro-fibrotiques, nous avons procédé à une immunofluorescence sur les fibroblastes isolés du ventricule gauche des cœurs de rats sham. Au niveau basal, l'expression de nestine est peu visible, tandis que l'expression de la protéine nestine est augmentée sous sa forme filamenteuse suite aux traitements de 24 heures avec AII, TGF- $\beta_1$  et EGF. De façon qualitative, nous pouvons affirmer qu'il y a une augmentation du collagène  $\alpha_1$  dans les fibroblastes isolés et traités avec les facteurs pro-fibrotiques (figure 3.17).

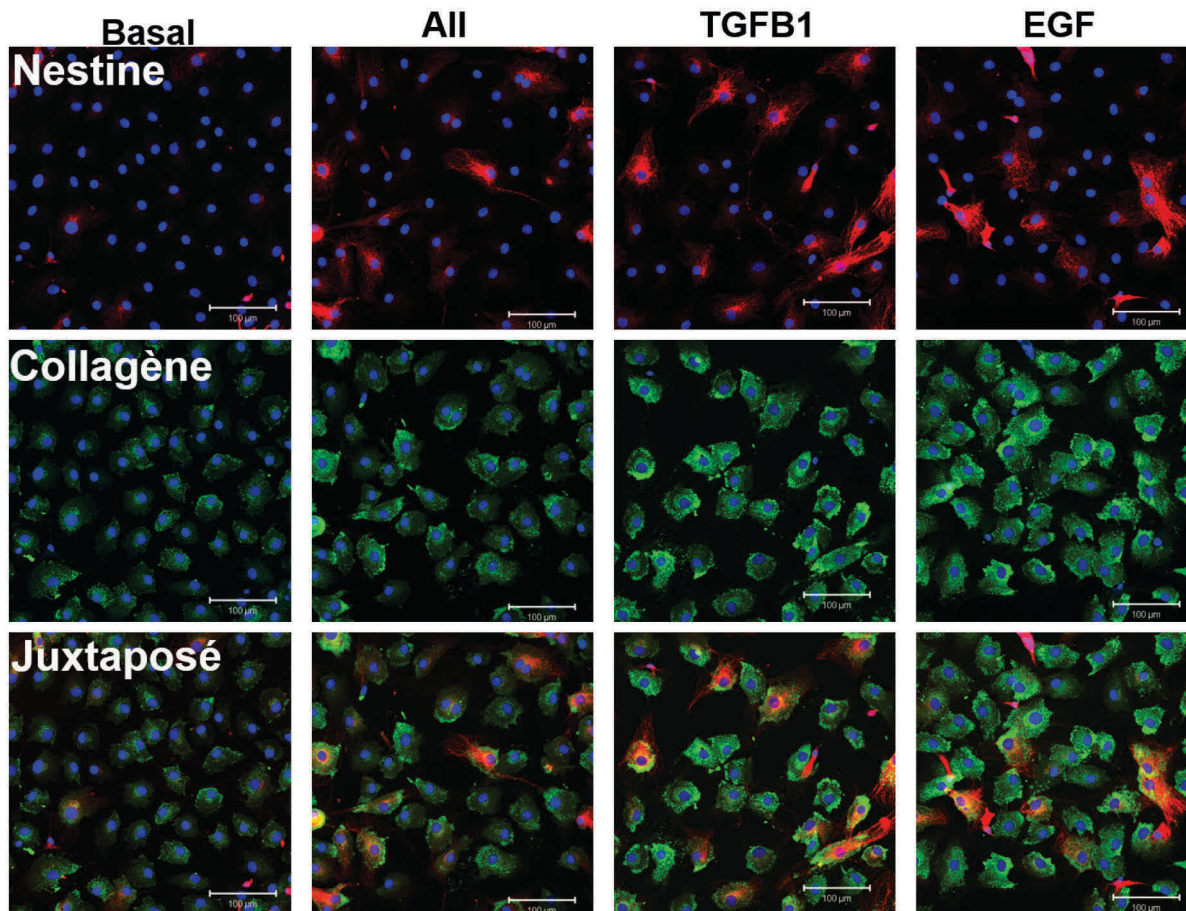


**Figure 3.15 : L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les fibroblastes normaux exposés aux facteurs pro-fibrotiques.** L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les fibroblastes isolés du ventricule des cœurs de rats sham, traités pendant 24 heures avec AII ( $10^{-6}$ M), TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) et EGF (10ng/mL), comparativement aux cellules non-traitées (Basal) (A et B). L'expression de l' $\alpha$ -SMA demeure inchangée dans les fibroblastes isolés suite aux traitements (A et B). (\*) signifie  $P < 0.05$  versus sham,  $n = 3-5$



**Figure 3.16 : L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les fibroblastes isolés des cœurs de rats, ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS), exposés aux facteurs pro-fibrotiques.** L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les fibroblastes isolés du ventricule des rats CAS traités pendant 24 heures avec AII ( $10^{-6}$ M), TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) et EGF (10ng/mL), comparativement aux cellules non-traitées (Basal) (A et B). L'expression de l' $\alpha$ -SMA demeure inchangée dans les fibroblastes isolés du ventricule des rats CAS (A et B). (\*) signifie  $P < 0.05$  versus sham,  $n = 3-5$ .



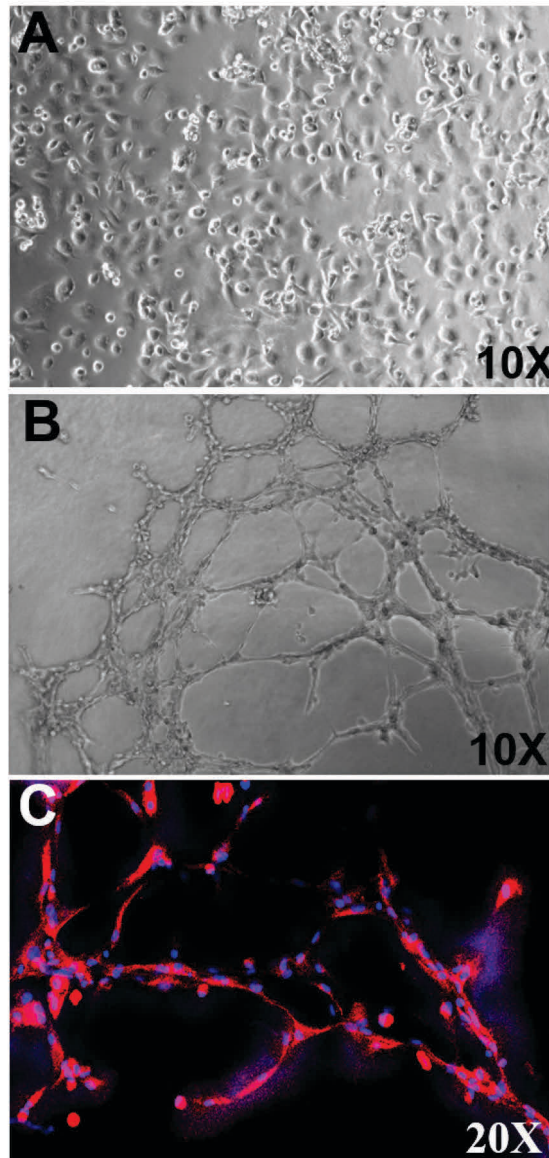


**Figure 3.17 : L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les fibroblastes normaux exposés aux facteurs pro-fibrotiques.** L'expression de la protéine nestine (fluorescence rouge), sous sa forme filamenteuse, est augmentée dans les fibroblastes isolés des ventricules des rats sham traités pendant 24 heures avec AII ( $10^{-6}$ M), TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) et EGF (10ng/mL) comparativement aux cellules non-traitées (Basal). De plus, l'expression de collagène  $\alpha_1$  (fluorescence verte) est augmentée dans les fibroblastes traités comparativement aux fibroblastes non-traités. Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).n= 3.

## **Les myofibroblastes récapitulent un phénotype de cellules endothéliales lorsque qu'on les dépose sur une matrice de Matrigel**

Il a été démontré par notre laboratoire que les myofibroblastes présents dans la cicatrice des rats infarcis récapitulent un phénotype de cellules endothéliales lorsque qu'on les dépose sur une matrice de Matrigel (147). Ce phénotype semble associé avec les myofibroblastes retrouvés en conditions pathologiques. Nous avons donc voulu vérifier si les myofibroblastes, qui sont retrouvés dans le cœur hypertrophié, exhibaient aussi ce phénotype.

Les myofibroblastes, isolés du ventricule gauche des rats CAS, récapitulent un phénotype endothélial lorsqu'on les dépose sur une matrice de Matrigel. Les cellules s'allongent afin de former des structures tubulaires semblables aux capillaires. Nous avons fixé les cellules 4 heures après le début de l'expérience et nous avons procédé à une technique d'immunofluorescence. La protéine nestine est exprimée dans l'allongement des myofibroblastes qui forment des structures tubulaires. Les fibroblastes de cœur de rats sham ne récapitulent pas ce phénotype, c'est-à-dire qu'aucun tubule n'est formé après 4 heures (figure 3.18).



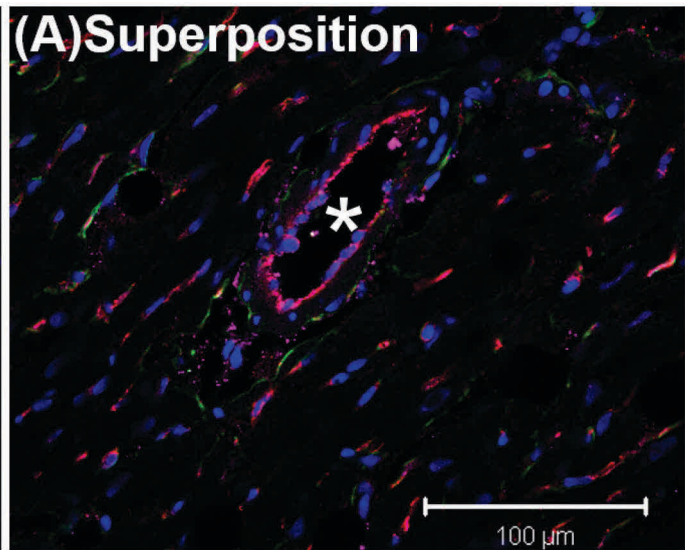
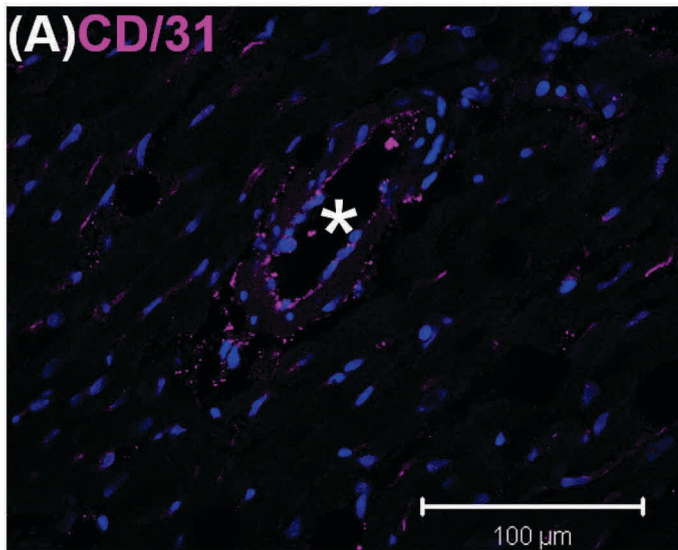
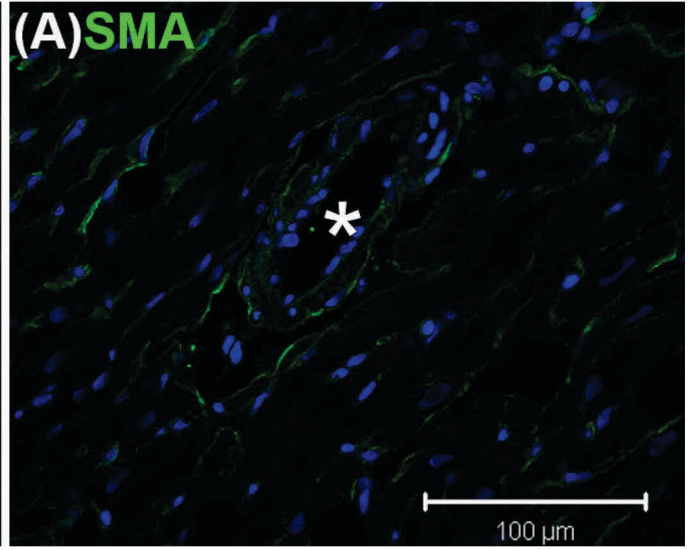
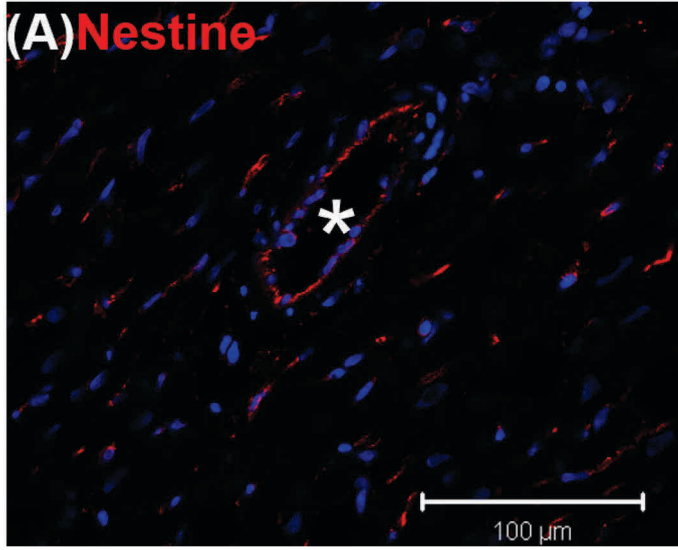
**Figure 3.18 : Les myofibroblastes récapitulent un phénotype endothélial sur Matrigel.** A) Les myofibroblastes isolés du ventricule gauche de rats CAS forment des tubules lorsqu'on les dépose sur une matrice de Matrigel. B) Les fibroblastes isolés du ventricule gauche de rats sham ne récapitulent pas ce phénotype lorsqu'on les dépose sur une matrice de Matrigel. C) La protéine nestine (rouge) est détectée via une technique d'immunofluorescence dans l'allongement des tubules formés par les myofibroblastes isolés du ventricule gauche des rats CAS. Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).

## **La présence de cellules co-exprimant la protéine nestine, CD31 et collagène**

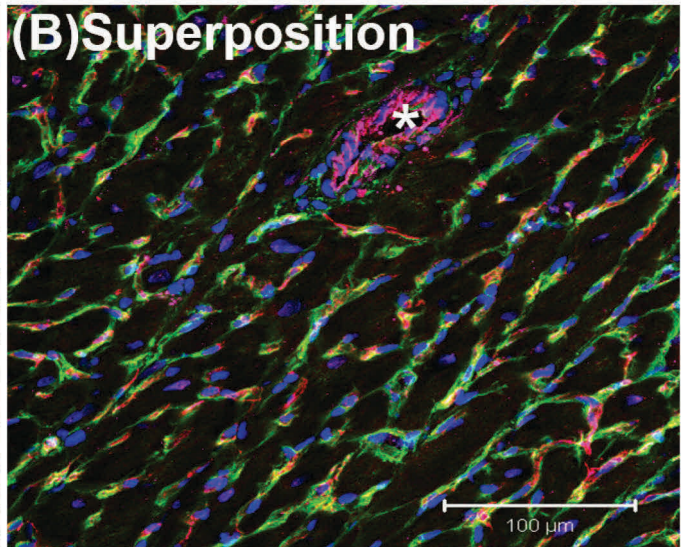
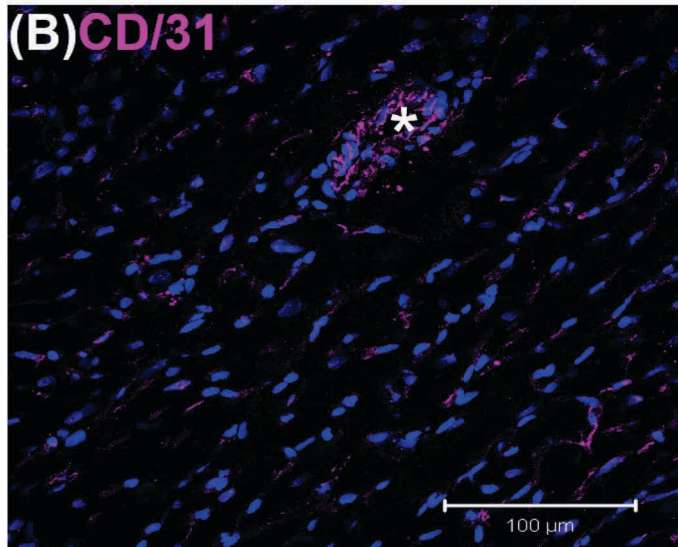
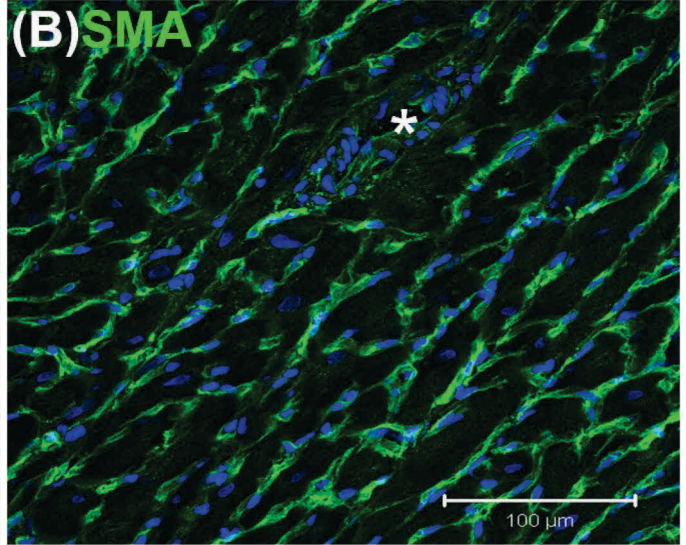
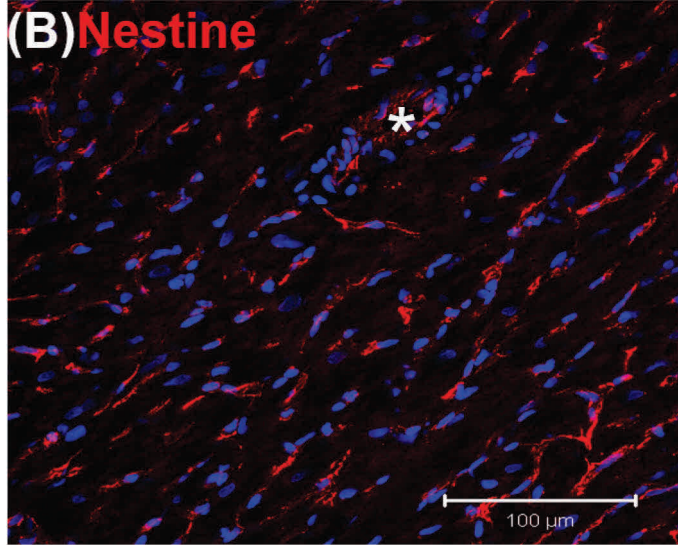
Les résultats précédents démontrent qu'une source cellulaire possible des myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup> réside en une sous-population de fibroblastes résidents qui prolifèrent et acquièrent un phénotype de fibroblastes activés. Nous nous sommes interrogés sur la possibilité des origines hétérogènes des fibroblastes activés nestine<sup>(+)</sup>. Parmi les processus de fibroses répertoriés dans la littérature, on y indique que les fibroblastes activés peuvent provenir de différentes sources cellulaires, entre autres des cellules endothéliales (148). Nous avons testé l'hypothèse qui postule que les fibroblastes activés nestine<sup>(+)</sup> proviennent des cellules endothéliales. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des techniques d'immunofluorescence dans le but d'identifier des cellules qui co-expriment des marqueurs mésenchymateux et endothéliaux avec la protéine nestine.

Le marquage de CD31 est détecté dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de différents calibres dans les cœurs des rats sham et CAS (figure 3.19). La protéine nestine est détectée dans les cellules vasculaires CD31<sup>(+)</sup>, cependant le marquage de nestine est variable et/ou absent dans plusieurs vaisseaux sanguins (figure 3.20). De plus, le collagène  $\alpha_1$  n'est pas visible dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins des cœurs de rats sham et CAS. Dans les cœurs de rats sham, une faible fraction de cellules déplacées CD31<sup>(+)</sup> qui co-expriment avec nestine et collagène  $\alpha_1$ , est détectée dans la région péri-vasculaire et dans la région interstitielle du ventricule gauche. La présence de ces cellules est aussi décelable dans les cœurs de rats CAS. La présence des cellules CD31<sup>(+)</sup> qui co-expriment avec nestine et collagène  $\alpha_1$  est toutefois plus augmentée dans les cœurs hypertrophiés (figure 3.19).

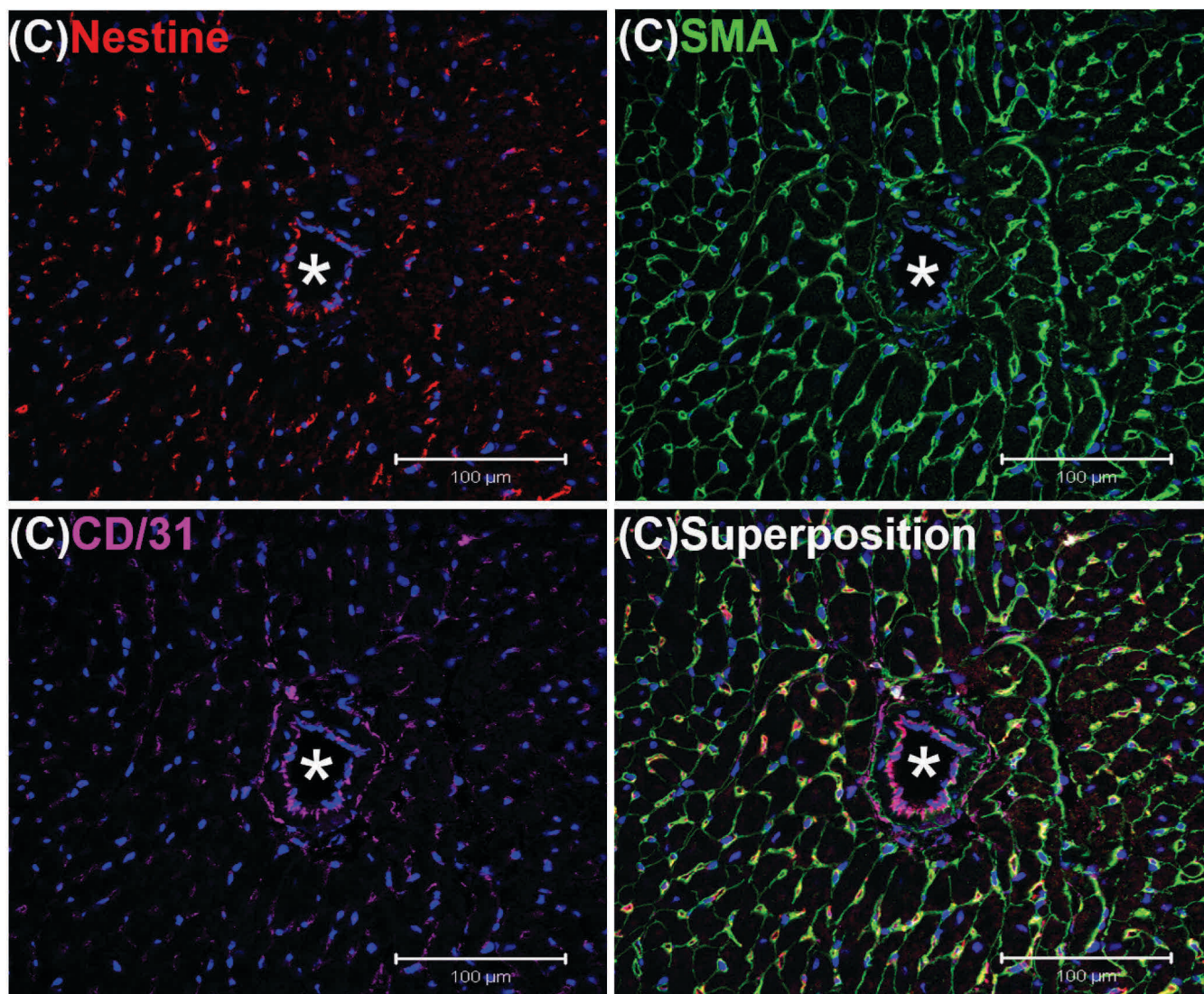
# SHAM



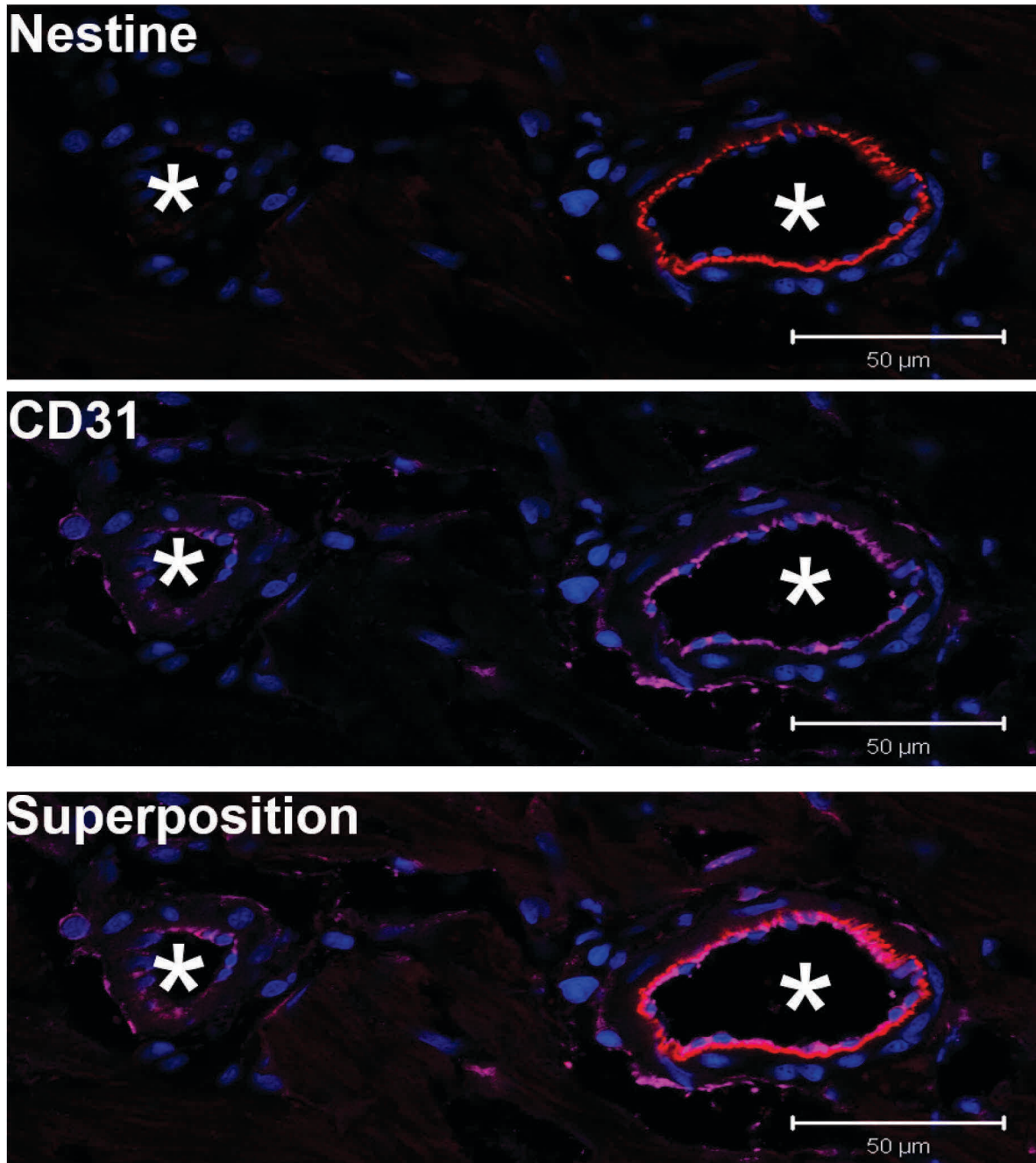
# CAS



CAS



**Figure 3.19 : Augmentation des cellules qui co-expriment collagène  $\alpha_1$ , CD31 et nestine dans les cœurs des rats ayant subi une constriction aortique supra-rénale (CAS) de deux semaines.** Il y a une augmentation des cellules qui co-expriment collagène  $\alpha_1$ , CD31 et nestine dans les cœurs de rats CAS (B et C), comparativement aux cœurs de rats sham (A). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur DAPI (fluorescence bleue). Les vaisseaux sanguins sont représentés par le symbole (\*).



**Figure 3.20 : Variation de l'expression de la protéine nestine dans les cellules endothéliales des vaisseaux du cœur.** Il y a une variation de la co-expression de CD31 et nestine dans l'endothélium des vaisseaux des cœurs de rats suivant une CAS de deux semaines et dans les cœurs de rats sham. Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue). Les vaisseaux sanguins sont représentés par le symbole (\*).



## **Les cellules endothéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux associé à l'expression de la protéine nestine**

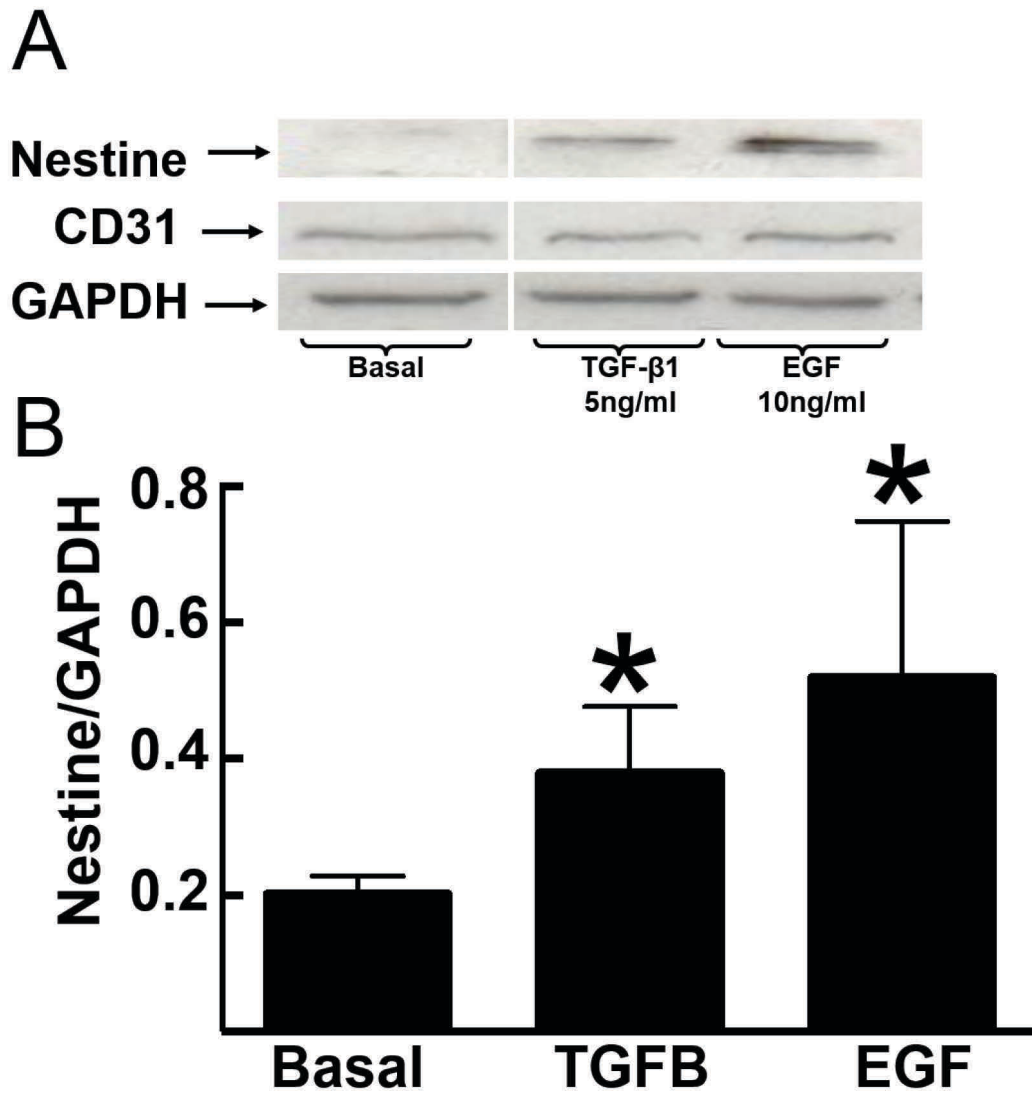
La présence de cellules qui co-expriment collagène  $\alpha_1$ , CD31 et nestine, dans la région non-vasculaire du ventricule gauche des rats CAS, suggère que les cellules endothéliales se déplacent et acquièrent un phénotype mésenchymateux dans une condition fibrotique. Afin de confirmer nos observations *in vivo*, nous avons mis en culture des cellules endothéliales de différentes origines sous l'influence de facteurs pro-fibrotiques.

L'expression de la protéine nestine est significativement augmentée dans les cellules endothéliales microvasculaires de cœurs de rats en culture qui sont exposées à un traitement de 24 heures avec TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) et EGF (10ng/mL), comparativement aux cellules non-traitées. L'expression de l' $\alpha$ -SMA demeure inchangée dans les cellules traitées (figure 3.21).

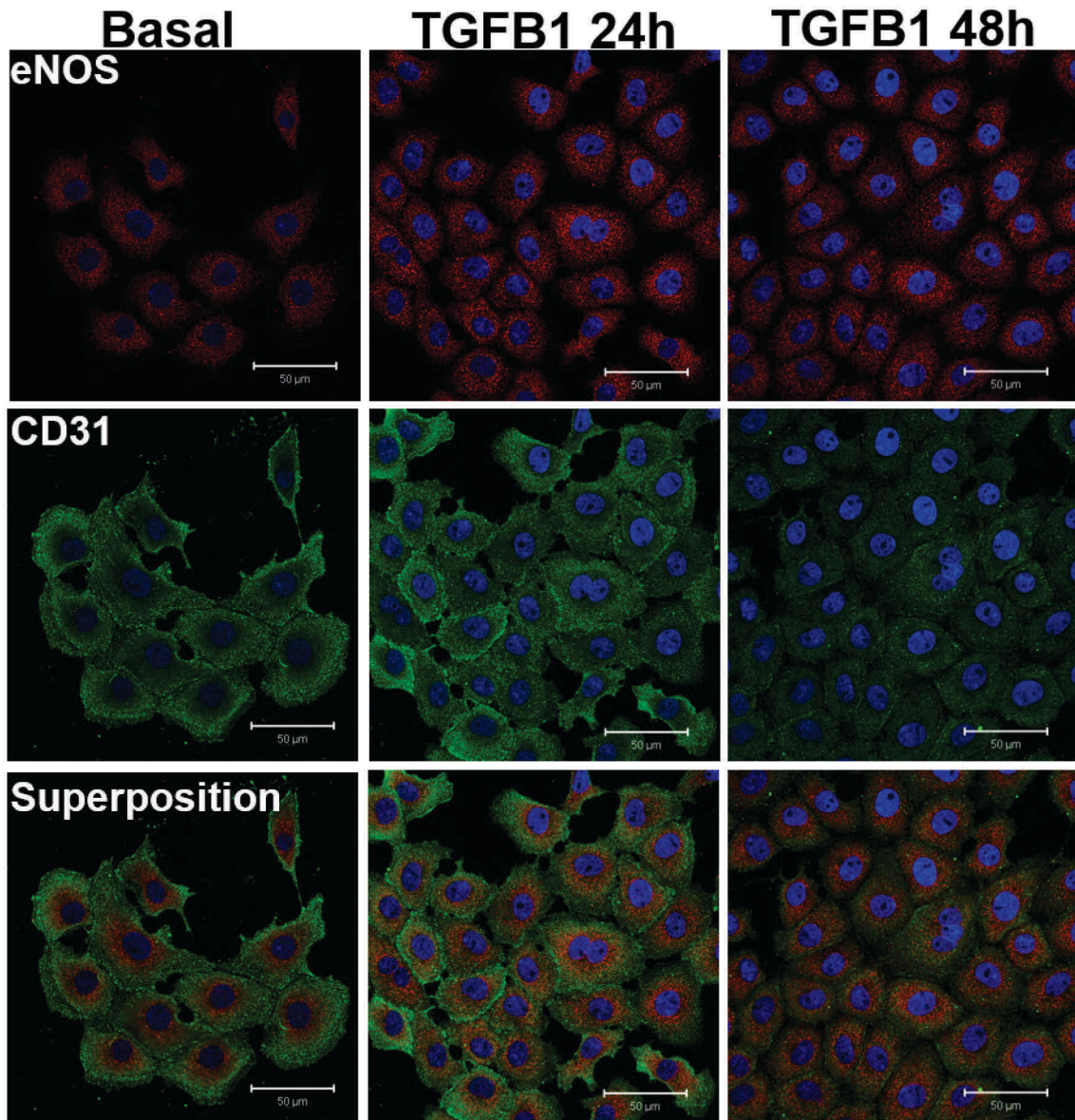
Les cellules endothéliales microvasculaires de cœurs de rats en culture co-expriment CD31 et eNOS. En plus des marqueurs de cellules endothéliales, nous observons qu'au niveau basal les cellules expriment le collagène  $\alpha_1$ , tandis que l'expression de nestine est indétectable. Nous observons via des techniques d'immunofluorescence que les cellules traitées avec TGF- $\beta_1$  pendant 48 heures perdent partiellement l'expression de CD31, tandis que l'expression d'eNOS demeure constante (figure 3.22). De manière consistante avec les résultats d'immunobuvardage de type Western Blot, l'expression de nestine est faible et/ou absente dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats non-traitées (basale) visualisée via une technique d'immunofluorescence. Après une stimulation de 48 heures avec TGF- $\beta_1$  (5ng/mL), la protéine nestine est induite dans les cellules endothéliales microvasculaires sous sa forme non-filamenteuse (figure 3.23).

Afin d'approfondir le rôle de la transition endothéliale mésenchymateuse (EndMT) dans l'apparition des myofibroblastes, nous avons traité les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines avec TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) pour une durée de 72 heures. En opposition avec les cellules endothéliales microvasculaires de rats, la protéine nestine, sous sa forme filamenteuse, est

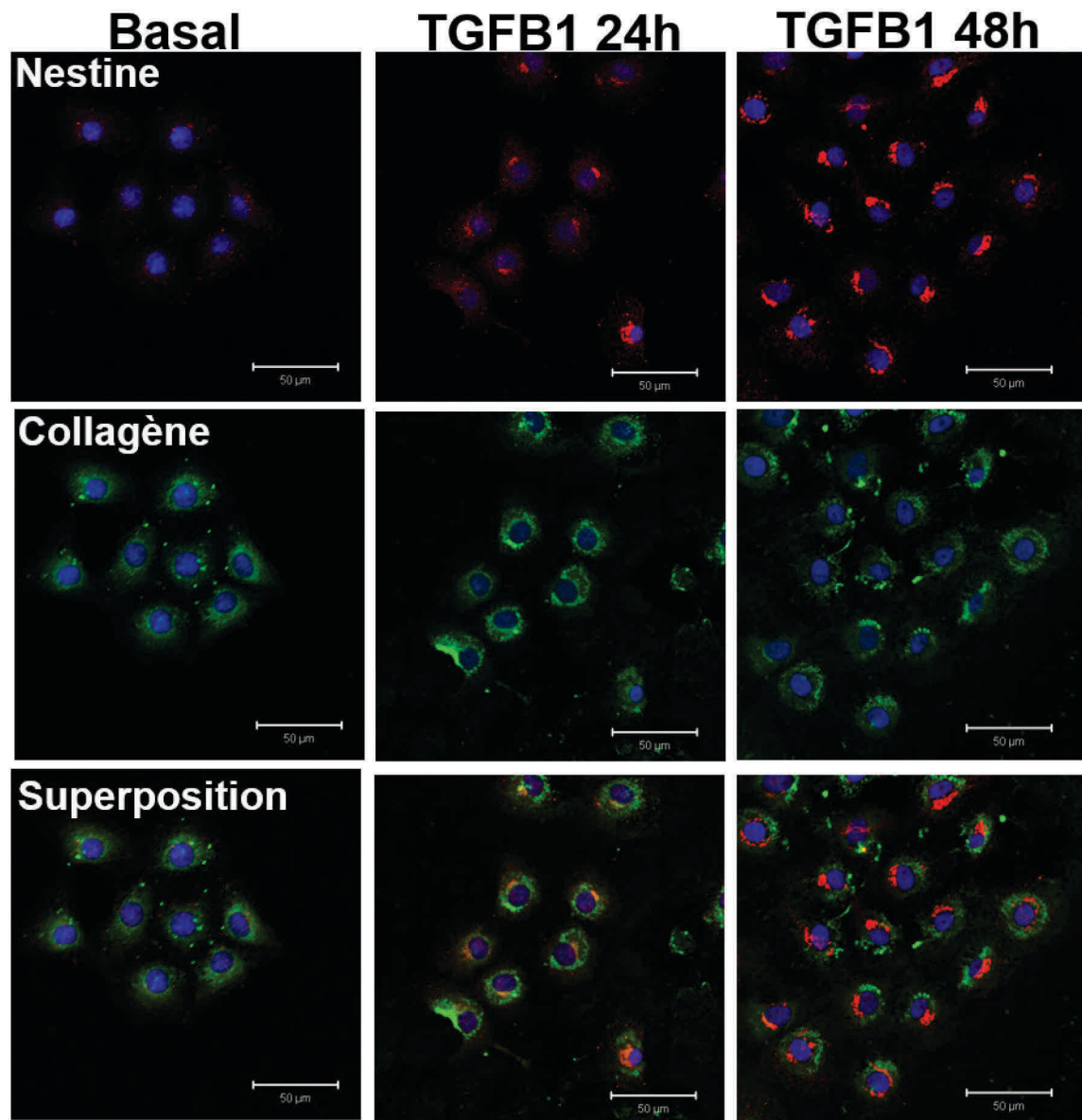
exprimée dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines non-traitées (basal), tandis que l'expression de collagène  $\alpha_1$  est faible et/ou absente. Après la stimulation avec TGF- $\beta_1$ , l'expression de nestine demeure inchangée dans les cellules endothéliales d'artère coronaires humaines, tandis qu'une augmentation du marquage de collagène  $\alpha_1$  est détectée (figure 3.24). Suite à la stimulation avec TGF- $\beta_1$ , l'expression d'eNOS demeure inchangée (figure 3.25)



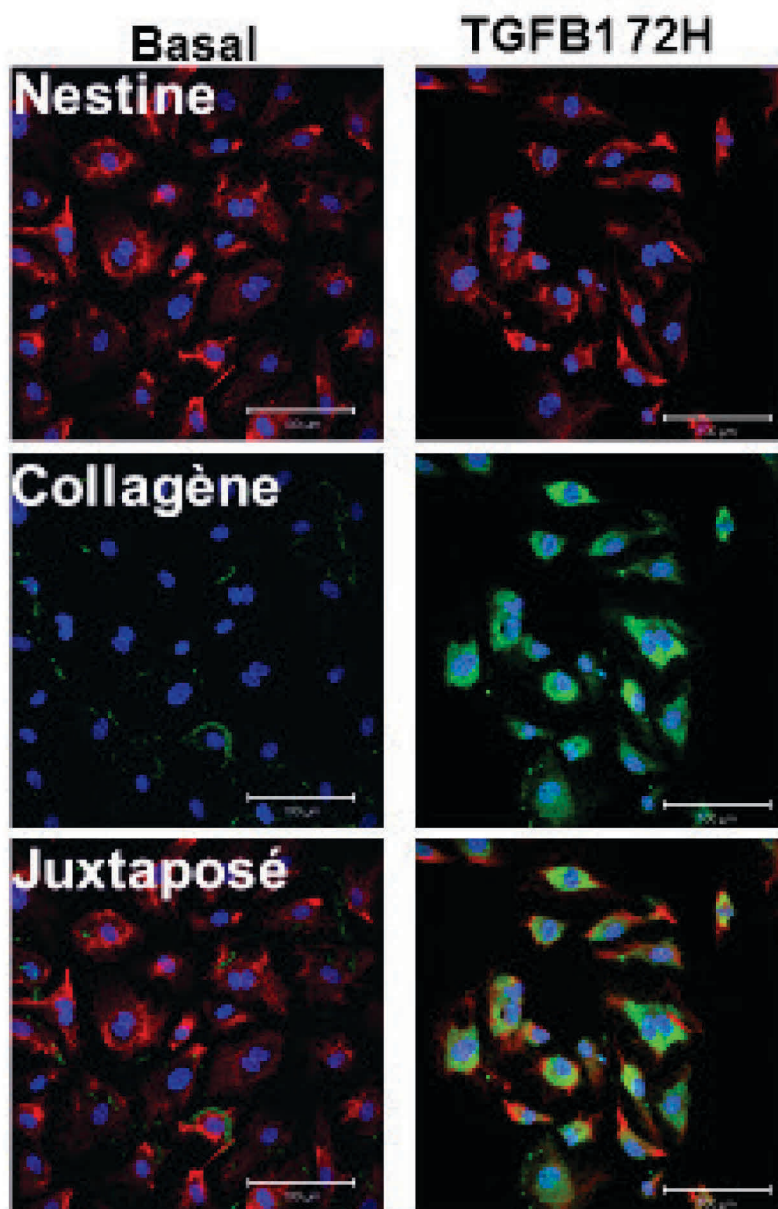
**Figure 3.21 : L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats exposées aux facteurs pro-fibrotiques.** L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats traitées pendant 24 heures avec TGF- $\beta_1$  (5ng/mL) et EGF (10ng/mL), comparativement aux cellules non-traitées (Basal) (A et B). L'expression de CD31 demeure inchangée suite aux traitements avec les facteurs pro-fibrotiques (A). (\*), signifie  $P < 0.05$  versus Sham,  $n = 3$ .



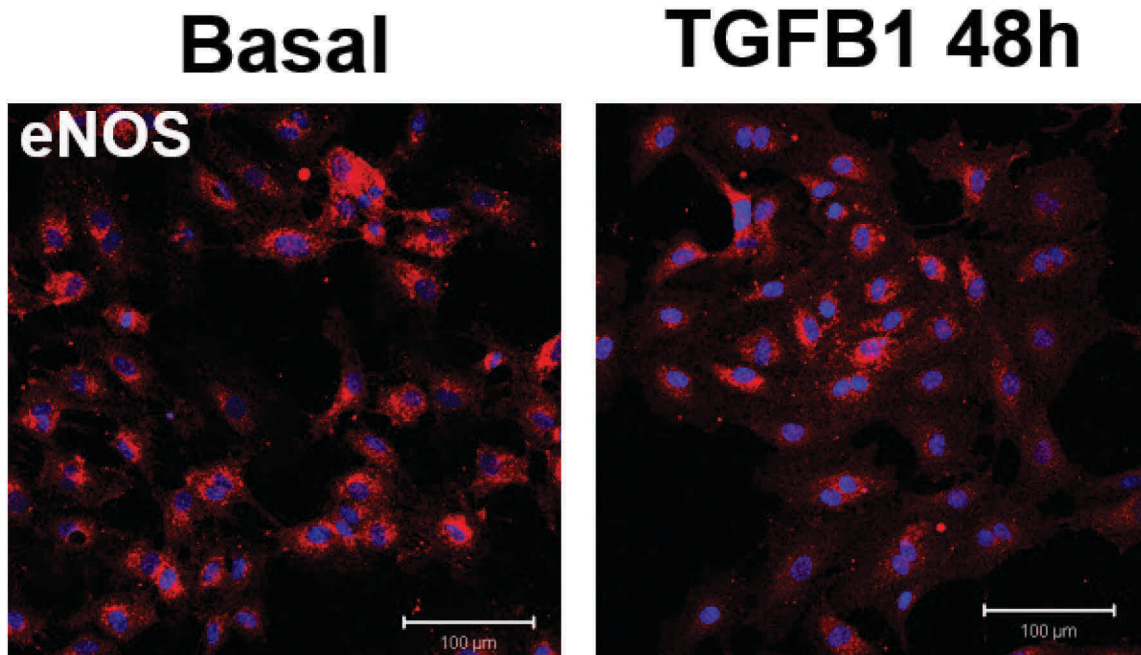
**Figure 3.22 : L'expression de la molécule d'adhésion cellulaire endothéliale plaquettaire (eNOS) est diminuée dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats suivant une stimulation de 48 heures au TGF- $\beta_1$ . L'expression de CD31 (fluorescence verte) est diminuée dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats exposées au TGF- $\beta_1$  (5ng/mL), tandis que l'expression de eNOS demeure inchangée (fluorescence rouge). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue). n=3.**



**Figure 3.23 : L'expression de la protéine nestine est augmentée dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats suivant une stimulation de 48 heures au TGF- $\beta_1$ . L'expression de la protéine nestine (fluorescence rouge) est augmentée dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats exposées au TGF- $\beta_1$  (5ng/mL), tandis que l'expression de collagène  $\alpha_1$  demeure inchangée (fluorescence verte). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue). n=2.**



**Figure 3.24 : L'expression de collagène  $\alpha_1$  est augmentée dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines suivant une stimulation de 72 heures au TGF- $\beta_1$ .** L'expression de collagène  $\alpha_1$  (fluorescence verte) est augmentée dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines exposées au TGF- $\beta_1$  (5ng/mL), tandis que l'expression de la protéine nestine, sous sa forme filamenteuse, (fluorescence rouge) demeure inchangée. Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).



**Figure 3.25 : L'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) demeure inchangée dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines suivant une stimulation de 72 heures au TGF- $\beta_1$ . L'expression de la protéine eNOS (fluorescence rouge) demeure inchangée dans les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines exposées au TGF- $\beta_1$  (5ng/mL). Les noyaux ont été identifiés avec le marqueur To-PRO-3 (fluorescence bleue).**

## **CHAPITRE 4 : DISCUSSION**



Les objectifs de notre étude sont de déterminer si la protéine nestine est un marqueur de myofibroblastes dans une condition fibrotique pathologique et de déterminer quelles sont les origines cellulaires de ces myofibroblastes. Afin de répondre à nos objectifs, nous avons mis au point une technique de constriction aortique supra-rénale qui mène à l'hypertrophie concentrique cardiaque et au développement d'une fibrose réactive chez le rat.

Dans la littérature scientifique, il existe plusieurs modèles qui induisent une hypertrophie concentrique et l'apparition de la fibrose réactive chez le rat. Nous retrouvons entre autres les modèles d'hypertension spontanée (spontaneously hypertensive rats), d'occlusion de l'artère rénale, de constriction aortique, de catécholamine et d'approche transgénique (149, 150). Comme nos études portent sur la phase aiguë du remodelage cardiaque dans le développement de l'hypertrophie, nous avons choisi de pratiquer le modèle de CAS. Ce choix est justifié puisqu'il s'agit d'un modèle bien établi dans notre laboratoire, les coûts reliés à ses procédures sont minimes et le taux de mortalité est faible. L'avantage principal de la technique de constriction aortique réside dans le développement rapide de la fibrose réactive dans le ventricule. Dans la littérature, ce modèle est très utilisé pour étudier les changements morphologiques qui surviennent lors de l'hypertrophie (149, 150).

Lorsque nous effectuons une CAS, le diamètre de l'aorte est considérablement réduit, de manière équivalente à l'aiguille 22G (procédure décrite à la page 51, dans la section 2.1.1) ce qui augmente la PAS et donc la post-charge, soit la résistance à laquelle s'oppose le ventricule gauche en systole (voir le tableau 3.1 à la page 65). Pour pallier à cette surcharge hémodynamique, le cœur subit un remodelage tel que défini par la loi de Laplace (voir la section 1.3.9.1 à la page 34). qui a pour conséquence d'augmenter la paroi du ventricule et par le fait même sa force de contraction (voir la figure 3.2 à la page 67) (52). Ce mécanisme permet au cœur de maintenir le stress systolique sur la paroi du ventricule et la fraction d'éjection lorsque la PAS est augmentée. En réponse à l'augmentation de la pression, la paroi du ventricule s'épaissit via l'hypertrophie des cardiomyocytes, plus précisément via la sarcomogénèse en parallèle (52). En plus d'effectuer un stress mécanique via le changement des paramètres hémodynamiques, ce modèle induit un stress endocrinien via le relâchement du peptide AII (151). Lorsque nous réduisons le diamètre de l'aorte, la perfusion rénale diminue. En réponse à

cette diminution du flot sanguin, les cellules juxtaglomérulaires libèrent la rénine dans le sang augmentant ainsi la concentration sanguine de rénine (10, 38, 39). La rénine va ensuite cliver l'angiotensinogène, produite par le foie, pour former l'AI (10, 38, 39). L'ACE produite dans les poumons, transforme l'AI en AII, ensuite relâchée dans la circulation sanguine (10, 38, 39). L'AII régule l'hypertrophie cardiaque dans notre modèle via son effet dans la circulation systémique. Elle provoque une constriction des vaisseaux sanguins et conséquemment, une augmentation de la pression artérielle (10, 38, 39). Cette augmentation se traduit par une augmentation de la post-charge sur le cœur. L'AII est aussi relâchée au niveau local, provoquant l'étirement mécanique et l'hypertrophie des cardiomyocytes (152). L'AII induit également une réponse mitogène des fibroblastes (46, 47). La régulation de ce peptide hormonal au niveau local et endocrinien dans le modèle de CAS provoque la prolifération des fibroblastes cardiaques et la réponse de fibrose réactive (52, 152, 153). Deux semaines après avoir effectué une CAS chez le rat, nous observons un dépôt de collagène dans la zone péri-vasculaire et dans la zone interstitielle du ventricule gauche (voir les figures 3.3 et 3.4 à la page 68 et 69 respectivement).

Après avoir caractérisé notre modèle animal, nous avons examiné le profil d'expression de la protéine nestine dans les groupes de rats. Nous avons démontré qu'il y a une augmentation significative de l'expression de la protéine nestine dans les rats CAS, comparativement aux rats sham (voir la figure 3.5 à la page 71). Dans le groupe de rats CAS, nous observons une variation de l'expression de la protéine nestine. Puisque les paramètres hémodynamiques des rats CAS sont aussi variables, nous avons procédé à des tests de corrélation pour déterminer si ceux-ci sont en mesure d'influencer l'augmentation de la protéine nestine dans le cœur. L'expression de la protéine nestine est positivement corrélée avec la PA, PAS, la PAD et la PSVG (voir les figures 3.6 à 3.8 aux pages 72 à 74). Comme démontré dans la littérature, l'augmentation de l'expression de la protéine nestine dans des conditions fibrotiques cardiaques peut être due à la présence de cette protéine dans différentes cellules (101, 123). Dans le cœur infarcté, la protéine nestine est exprimée dans une population de cellules souches neurales progénitrices, de cardiomyocytes, de myofibroblastes et de cellules endothéliales (101). Nous retrouvons également un processus de fibrose réactive dans le ventricule non-infarcté du cœur des rats ayant subi un infarctus du myocarde. Par conséquent, nous pouvons extrapoler sur la présence de nestine dans les mêmes types cellulaires suivant une CAS.

La protéine nestine est impliquée au niveau de la fonctionnalité du cytosquelette, de la motilité, de la prolifération, de la migration, de la survie et de la différenciation des cellules qui l'expriment (94, 154, 155). Cette protéine est présente pendant le développement des différents tissus de notre organisme et son expression diminue lorsque les tissus ont atteint la maturité (94, 120). De fait, la protéine nestine est impliquée pendant l'embryogénèse du cœur (108). Il semblerait que l'expression de la protéine nestine soit associée avec la prolifération cellulaire. Une surexpression de cette protéine au stade de l'embryogénèse provoque donc la prolifération des cardiomyocytes (156). La réexpression de la protéine nestine dans les tissus matures est souvent associée à la régénération d'un tissu suite à une blessure et à la réponse proliférative des cellules (157–160, 123). La protéine nestine pourrait jouer un rôle dans le processus mitotique des cellules ou encore dans des processus anti-apoptotiques (161). Plusieurs études ont démontré la présence de la protéine nestine lors du processus de fibrose réparative suite à un infarctus du myocarde (101, 123, 162). Nous avons donc cherché à déterminer si la présence de cette protéine pouvait être détectée dans la fibrose réactive dans le cœur.

Afin de déterminer dans quels types cellulaires la protéine nestine est exprimée, nous avons procédé à des techniques d'immunofluorescence avec les marqueurs de différentes cellules qui se retrouvent dans le cœur. Les analyses en microscopie confocale nous ont permis de visualiser la présence de la protéine nestine dans une sous-population de cardiomyocytes, de myofibroblastes associés avec l'expression de collagène  $\alpha_1$ , de cellules endothéliales associées avec l'expression de CD31, alors que la nestine est absente dans les cellules musculaires lisses (voir les figures 3.9 à 3.14 aux pages 77 à 84). Dans la littérature, la présence de cardiomyocytes immunopositifs à la protéine nestine est répertoriée suite à un infarctus du myocarde, dans la zone péri-infarciée chez le rat, chez la souris et chez l'humain. (101, 127, 157, 163, 164). Les études au sujet de la présence de ces cellules demeurent incomplètes et à l'heure actuelle nous ne pouvons pas affirmer avec certitude l'implication fonctionnelle de la protéine nestine dans les cardiomyocytes. Certains auteurs suggèrent que la présence de cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> est due à la différenciation des cellules souches neurales progénitrices résidentes cardiaques, tandis que des résultats préliminaires de notre laboratoire nous ont permis de poser une hypothèse alternative (165). Selon nos études, les cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup> présents suite à l'infarctus du myocarde appartiennent à une population endogène qui aurait la possibilité de ré-exprimer la

protéine nestine. Puisque la protéine nestine est reconnue pour son implication dans la prolifération et la migration cellulaire, nous avons suggéré que cette protéine pouvait être un marqueur de la réentrée des cardiomyocytes dans le cycle cellulaire et par ce fait même d'un phénotype prolifératif. Par conséquent, la protéine nestine pourrait jouer un rôle dans la régénération cardiaque dans la zone péri-infarctée (166). Malgré les différentes hypothèses qui existent sur l'origine et le rôle des cardiomyocytes nestine<sup>(+)</sup>, ce sujet demeure une source de controverse. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider les stimuli qui provoquent l'apparition de ces cellules et leur fonction dans les cardiomyopathies.

Nos analyses en microscopie confocale nous ont également permis d'identifier la protéine nestine dans une sous-population de myofibroblastes dans le ventricule hypertendu (voir les figures 3.10 et 3.11 aux pages 78 à 80). La présence de la protéine nestine a été documentée dans une sous-population des myofibroblastes dans des conditions de fibrose réparative suivant l'infarctus du myocarde (123). De plus, la protéine nestine est impliquée dans la prolifération des myofibroblastes qui survient suite à une blessure dans différents organes tels que le cœur et le rein (123, 139, 167). L'expression de protéine nestine dans les myofibroblastes du cœur hypertendu pourrait accentuer leur réponse proliférative et accélérer la réponse de fibrose réactive. Nos résultats démontrent la présence de myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup> entre les fibres musculaires cardiaques et dans la zone péri-vasculaire des vaisseaux du ventricule hypertrophié. La présence de myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup> coïncide avec les zones où l'accumulation de collagène est rendue visible par les colorations au trichrome de Masson. Bien que le rôle de la protéine nestine fût établi dans la prolifération des fibroblastes, les mécanismes sous-jacents à la prolifération et l'implication de la protéine nestine demeurent toujours inconnus. À l'heure actuelle, plusieurs groupes d'études tentent d'élucider l'apport de la protéine nestine dans les mécanismes de prolifération cellulaire.

En plus de retrouver la protéine nestine dans une sous-population de cardiomyocytes et de myofibroblastes, nous avons observé la présence de nestine dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (voir les figures 3.12 à 3.13 aux pages 81 à 82). Ce phénotype est variable puisque dans l'endothélium de certains vaisseaux sanguins, l'expression de ce filament intermédiaire est absente et/ou faible. Il serait intéressant de mesurer le diamètre des vaisseaux

afin d'établir une corrélation avec la présence de nestine pouvant expliquer cette variabilité. Suivant une CAS de deux semaines, nous avons observé que des cellules endothéliales CD31<sup>(+)</sup> et nestine<sup>(+)</sup> se sont déplacées dans les zones interstitielles et péri-vasculaires, caractérisées par un dépôt accru de collagène. Une hypothèse qui pourrait expliquer la présence de ces cellules, réside dans l'activation du processus d'EndMT. Dans ce processus, les cellules endothéliales acquièrent un phénotype migratoire qui leur permet de sortir des vaisseaux. Il est plausible que la protéine nestine soit induite dans les cellules endothéliales et qu'elle améliore leur fonction migratoire. Par ailleurs, les cellules endothéliales isolées provenant d'artères coronaires humaines expriment la protéine nestine au niveau basal.

Lors de nos études de localisation de la protéine nestine, nous avons observé une absence du marquage de cette protéine avec l' $\alpha$ -SMA (voir la figure 3.14 à page 84). Nos résultats démontrent que les cellules musculaires lisses et les péricytes sont immunopositifs à l'expression de l' $\alpha$ -SMA. Par contre, l'expression de l' $\alpha$ -SMA dans la zone fibrotique péri-vasculaire est inexistante, alors que nous observons une faible expression de l' $\alpha$ -SMA entre les fibres musculaires cardiaques. Bien que l' $\alpha$ -SMA soit largement considérée comme un marqueur des myofibroblastes en conditions fibrotiques, il semblerait que son expression dans un modèle de CAS soit minime. Le groupe de Moore-Morris, via un modèle de souris transgénique marquant les myofibroblastes par le gène du collagène, a démontré que seulement 15 % des myofibroblastes expriment l' $\alpha$ -SMA dans la région interstitielle et que l'expression de l' $\alpha$ -SMA était indétectable dans la zone fibrotique péri-vasculaire (29). En outre, il nous semble que l' $\alpha$ -SMA n'est pas un marqueur désigné pour identifier les myofibroblastes dans le modèle animal de CAS (29). Pour cette raison, nous avons choisi le marqueur de collagène  $\alpha_1$  afin d'identifier les fibroblastes et les myofibroblastes. Nos résultats suggèrent donc que la protéine nestine est un marqueur plus approprié des myofibroblastes en condition de fibrose réactive chez le rat, que le marqueur standard  $\alpha$ -SMA.

Notre analyse qualitative de l'expression de la protéine nestine nous a permis d'établir le profil de cette protéine dans différents types cellulaires. De cette manière, il nous a été possible d'identifier la source principale cellulaire, quant à l'augmentation de nestine dans les rats hypertendus, comme étant les myofibroblastes. Nous avons ensuite tenté de déterminer

quelles étaient les origines de cette population de myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup>. Dans la littérature, il est indiqué que les myofibroblastes impliqués dans la fibrose proviennent de la prolifération des fibroblastes résidents, des cellules souches de la moelle osseuse, des cellules épithéliales et des cellules endothéliales (64). Nous avons ensuite choisi de cibler la contribution des fibroblastes résidents et des cellules endothéliales afin d'étudier l'apparition des myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup>.

L'isolation des fibroblastes du ventricule normal et hypertrophié a été confirmée avec l'expression de l' $\alpha$ -SMA via les techniques d'immunobuvardages de type Western Blot. En effet, il a été démontré que la mise en culture *in vitro* des fibroblastes provoque l'induction de l' $\alpha$ -SMA (168). De plus nous avons réaffirmé le phénotype des fibroblastes avec l'expression de collagène  $\alpha_1$  via les techniques d'immunofluorescence (voir les figures 3.15 à 3.17 aux pages 86 à 88). L'exposition des fibroblastes provenant des ventricules normaux et hypertrophiés aux facteurs pro-fibrotiques AII, TGF- $\beta_1$  et EGF provoque l'augmentation de l'expression de la protéine nestine, comparativement aux fibroblastes non-traités. En outre, les techniques d'immunofluorescences nous permettent de visualiser l'augmentation de l'expression de la protéine nestine dans les myofibroblastes, sous sa forme filamenteuse, suite aux traitements pro-fibrotiques. Le phénotype filamenteux de la protéine nestine signifie qu'elle forme un hétérodimère. Lorsque la protéine nestine est exprimée sous sa forme non-filamenteuse, c'est-à-dire qu'elle ne forme pas d'hétérodimère. La forme filamenteuse de la protéine nestine est associée avec les effets biologiques de cette protéine, tandis que la forme non-filamenteuse est plutôt associée avec la dégradation cette protéine. Il est reconnu que la protéine nestine est incapable de s'homodimériser et forme donc un hétérodimère avec d'autres filaments intermédiaires tels que vimentine et desmine (96, 97). Il aurait été possible d'effectuer une immunofluorescence avec des anticorps primaires contre ces protéines afin de visualiser la formation de l'hétérodimère, dans lequel nestine est impliquée. Nous avons choisi de ne pas procéder à cette expérience puisque la présence vimentine est bien établie dans les fibroblastes adultes (18). Ainsi, les myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup> que l'on retrouve dans le ventricule hypertendu peut être attribué en partie à l'induction de ce filament intermédiaire dans les fibroblastes, par les facteurs pro-fibrotiques présents dans cette pathologie.

Nos résultats démontrent que la protéine nestine est co-exprimée dans l'endothélium de certains vaisseaux et que, suivant une constriction aortique, une population de cellules CD31<sup>(+)</sup> non-vasculaires exprime nestine. Afin de déterminer la participation de ces cellules à l'EndMT, un processus défini par la perte des marqueurs endothéliaux et le gain des marqueurs mésenchymateux, nous avons effectué un triple marquage, de CD31, de nestine et de collagène  $\alpha_1$ . De plus, ce processus est limité dans le temps, c'est-à-dire qu'une cellule en transition co-exprime les marqueurs endothéliaux et mésenchymateux, alors qu'une cellule ayant subi une EndMT exprime seulement les marqueurs mésenchymateux (58, 62). Lors de nos analyses de microscopie confocale, nous observons une population hétérogène de cellules dans les tissus. Certaines cellules sont immunopositives aux 3 marquages, certaines sont seulement positives à l'expression de nestine et CD31, alors que certaines cellules seulement sont positives à l'expression de nestine et de collagène  $\alpha_1$  (voir la figure 3.19 aux pages 92 à 94). Cette hétérogénéité suggère que nous observons différents stades du processus d'EndMT et que nestine pourrait constituer un marqueur ou être impliqué dans ce processus via son rôle dans la migration des cellules. Il nous est pourtant impossible de déterminer si les cellules positives à l'expression de nestine et de collagène  $\alpha_1$  sont des fibroblastes résidents exprimant la protéine nestine suite à l'exposition aux facteurs pro-fibrotiques, que l'on retrouve dans le cœur hypertendu. Il pourrait s'agir de cellules endothéliales ayant subi un changement de phénotype complet qui est caractérisé par la perte des marqueurs mésenchymateux et qui est associé à l'expression de nestine.

La transition des cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux a été répertoriée dans le développement embryonique du cœur et dans le processus de fibrose réparative suivant un infarctus du myocarde et dans le processus de fibrose réactive secondaire à l'hypertension artérielle (59, 60, 62). La contribution de l'EndMT dans des conditions de fibrose réactive demeure néanmoins sujet à débat quant au nombre de myofibroblastes dérivés de ce processus. En effet, l'étude de Zeisberg, parue en 2007, indique que le nombre de cellules provenant de l'EndMT suite à une constriction aortique est d'environ 30% (81). Cette étude est d'abord critiquée parce que le marqueur choisi pour détecter les myofibroblastes est le FSP1. En effet, le FSP1 est un marqueur non-spécifique aux myofibroblastes cardiaques et peut être exprimé par les cellules endothéliales et les cellules immunitaires (29). Afin de réévaluer la

contribution des cellules endothéliales dans l'apparition de myofibroblastes, l'équipe de Moore-Morris a procédé à la caractérisation des myofibroblastes avec l'usage de plusieurs souris transgéniques, dont une marquant les cellules qui possèdent le gène qui code le collagène  $\alpha_1$ , une marquant les cellules d'origine épithéliales et finalement, une marquant les cellules d'origine endothéliales (29). Cette étude laborieuse a permis au groupe d'identifier de manière quantitative l'origine des fibroblastes dans le cœur normal et dans le cœur hypertendu suivant une constriction aortique. Les résultats de leur recherche ont démontrés que 92% des fibroblastes du ventricule gauche et droit sont d'une origine endothéliale, alors que 12% proviennent de l'épicaarde (29). De surcroît, 95% des fibroblastes composant le cœur sont dérivés des cellules de l'épicaarde ou de l'endocarde, lors de la formation de l'embryon, alors que 5% des fibroblastes demeurent d'une origine inconnue (29). Cette distribution est conservée après une constriction aortique, ce qui suggère que les myofibroblastes proviennent de la prolifération des fibroblastes résidents plutôt que de l'activation du programme d'EndMT dans les cellules endothéliales (29). Par rapport aux études précédemment citées, notre étude ne vise pas la quantification des myofibroblastes provenant de l'EndMT mais plutôt une analyse qualitative de ce processus afin de déterminer s'il s'agit d'une source possible dans l'apparition des myofibroblastes nestine<sup>(+)</sup>. Malgré tout, nous nous devons de considérer l'étude Moore-Morris qui stipule que l'EndMT ne joue pas un rôle dans l'apparition des myofibroblastes et que ceux-ci proviennent plutôt de la prolifération des fibroblastes d'origine endothéliale embryonique. Ainsi, la présence de cellules immunopositives à l'expression des 3 marquages, dans notre étude, dément les résultats présentés par le groupe de Moore-Morris. En effet, la présence de cellules exprimant simultanément des marqueurs endothéliaux et mésenchymateux suggère que le programme d'EndMT est activé dans les cellules endothéliales. Dans le même ordre d'idée, dans l'étude de Moore-Morris, les fibroblastes résidents visibles grâce aux souris transgéniques sont soit d'origine endothéliale ou épithéliale (29). De ce fait, comme les proportions des différentes origines de fibroblastes sont conservées, aucun programme d'EndMT n'est activé (29). Afin de confirmer que l'EndMT ne joue pas un rôle dans l'apparition des myofibroblastes suite à une constriction aortique, le groupe de Moore-Morris a généré un modèle souris *VE-cadherin-CreERT2<sup>+/-</sup> collagen1a1-GFP<sup>+/-</sup> Rosa-tdT<sup>+/-</sup>* qui identifie les myofibroblastes via le gène de collagène  $\alpha_1$  et les cellules de provenance endothéliales via le gène VE-cadhérine (29). Une semaine et quatre semaines suivant la procédure de constriction aortique sur ces souris, le double



signal VE-cadherin-*CreERT2 Rosa-tdT* et le marquage CD31 sont co-exprimés de manière exclusive dans les vaisseaux sanguins qui est aussi caractérisé par l'absence de collagène  $\alpha_1$  (29). Toutefois, les auteurs n'expliquent pas la présence de cellules CD31 non-vasculaires ne co-exprimant aucun autre marquage (figure 6 de la référence 29). Parallèlement, suite à une constriction aortique 1 semaine, nous retrouvons ces cellules endothéliales déplacées des vaisseaux dont l'intégrité semble corrompue, qui sont positives à l'expression de nestine et de CD31.

Nous avons démontré que la fibrose réactive dans le cœur hypertendu est caractérisée par la présence de cellules CD31<sup>(+)</sup>, déplacées des vaisseaux sanguins, qui co-expriment nestine et collagène  $\alpha_1$  (voir la figure 3.19 aux pages 92 à 94). Toutefois, nous ignorons si la présence de la protéine nestine est induite dans les cellules endothéliales avant ou après leur migration dans l'espace interstitiel. Cependant, il est important de noter que les cellules endothéliales CD31<sup>(+)</sup> comprises dans les vaisseaux sanguins n'expriment pas le collagène  $\alpha_1$ . Afin d'investiguer la présence de la protéine nestine dans le processus d'EndMT, nous avons procédé à l'étude *in vitro* de ce processus avec des cellules endothéliales provenant de vaisseaux de calibre différents. Dans cet ordre d'idée, nous avons utilisé des cellules endothéliales microvasculaires de rats et des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines. Afin de stimuler le changement de phénotype des cellules endothéliales nous les avons soumises à un traitement avec le facteur TGF- $\beta_1$  décrit comme étant un stimulus qui provoque l'EMT et l'EndMT. Dans un premier temps, nous avons procédé à la mise en culture des cellules endothéliales microvasculaires de rats. Le phénotype de ces cellules a été confirmé via les techniques d'immunofluorescence par l'expression des marqueurs endothéliaux CD31 et eNOS (voir la figure 3.22 à la page 99). Par ailleurs, la présence de collagène  $\alpha_1$  est détectée au niveau basal dans ces cellules, alors que la protéine nestine est indécélable (voir la figure 3.23 à la page 100). Suite au traitement avec le TGF- $\beta_1$ , nous observons la diminution de l'expression de CD31 et l'augmentation de la protéine nestine, alors qu'aucun changement ne survient dans l'expression de collagène  $\alpha_1$  et eNOS. En se basant sur cette expérience, il nous est impossible de confirmer un changement de phénotype chez ces cellules, entre autres parce que les marqueurs endothéliaux sont toujours présents après un traitement de 48 heures avec TGF- $\beta_1$ . Par ailleurs, l'utilisation de collagène  $\alpha_1$  pour identifier le gain d'un phénotype mésenchymateux

s'est avérée peu indicative, dans la mesure où les cellules produisent cette composante de l'ECM au niveau basal. La présence du collagène  $\alpha_1$  dans ces cellules pourrait permettre de caractériser les cellules CD31<sup>(+)</sup> non-vasculaires qui expriment des propriétés fibrotiques, puisque la mise en culture des cellules endothéliales ne représente pas l'environnement qui les lie à la fonctionnalité du vaisseau. Il serait alors possible d'envisager que les cellules endothéliales microvasculaires de rats puissent être directement impliquées dans la fibrose réactive dans le cœur hypertendu via la synthèse et la relâche du collagène  $\alpha_1$ . De plus, nous avons confirmé qu'il était possible d'induire l'expression de la protéine nestine dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats avec les techniques d'immunobuvardages de type Western Blot suivant un traitement de 24 heures avec les facteurs pro-fibrotiques TGF- $\beta_1$  et EGF (voir la figure 3.21 à la page 98). Avec les techniques d'immunofluorescence, nous détectons cependant l'expression de la protéine nestine, sous sa forme non-filamenteuse, suite au traitement avec le TGF- $\beta_1$ . Il serait donc inadéquat d'élaborer sur la fonction de ce filament intermédiaire dans les cellules endothéliales microvasculaires de rats. Nous avons tout de même choisi d'examiner une autre source potentielle cellulaire pouvant agir à titre de substrat dans le processus d'EndMT *in vitro*, soit les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines. Le phénotype de ces cellules a été d'abord confirmé par la présence de CD31 (voir la figure 3.25 à la page 102). En outre, contrairement aux cellules endothéliales microvasculaires de rat, les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines expriment au niveau basal la protéine nestine, sous sa forme filamenteuse, alors que l'expression de collagène  $\alpha_1$  est absente. Suite au traitement de 72 heures avec le TGF- $\beta_1$ , les cellules acquièrent un phénotype mésenchymateux caractérisé par la synthèse de collagène  $\alpha_1$ , alors que l'expression de nestine est toujours visible sous sa forme filamenteuse (voir la figure 3.24 à la page 101). Puisque la présence de la protéine nestine est détectée avant le changement de phénotype, il nous est impossible de savoir si elle est nécessaire dans le processus de transition sans effectuer des expériences supplémentaires. Toutefois, nous émettons l'hypothèse selon laquelle la protéine nestine joue un rôle dans la migration des cellules qui acquièrent un phénotype mésenchymateux et que l'on retrouve à proximité des vaisseaux sanguins dont l'intégrité est corrompue.

De façon complémentaire, il a été démontré qu'une des caractéristiques des myoïbroblastes provenant de l'EMT consistait en leur habilité à récapituler un phénotype

épithélial. Ce phénomène a été largement documenté lors de la formation de l'embryon. Néanmoins, cette réversibilité des phénotypes dans le processus d'EndMT n'a pas encore été documentée. Lors de la caractérisation des fibroblastes isolés des ventricules normaux et hypertendus, nous avons procédé à la mise en culture de ces cellules sur une matrice de Matrigel. Cette matrice favorise ainsi la formation de structures tubulaires, qui ressemblent à des capillaires, par les cellules endothéliales (169). Nos résultats ont démontrés qu'une sous-population des myofibroblastes isolés du ventricule hypertendu récapitule ce phénotype via la formation de tubules, alors que les fibroblastes provenant du ventricule normal sont incapables de récapituler ce phénotype. De plus, la formation des tubules par une sous-population des myofibroblastes du ventricule hypertendu a été caractérisée par la co-expression de la protéine nestine (voir la figure 3.18 à la page 90). Ces résultats suggèrent donc qu'une sous-population des myofibroblastes des ventricules hypertendus provient des cellules endothéliales et seraient aptes à effectuer la transition inverse associée avec l'expression de la protéine nestine.

Lors de notre étude nous avons réaffirmé que le collagène  $\alpha_1$  est le marqueur le plus approprié afin d'identifier les fibroblastes cardiaques, ce qui est soutenu dans l'article de Moore-Morris (29). De façon concordante avec l'étude de Zeisberg, nous avons réussi à démontrer de nouvelles évidences suggérant que les cellules endothéliales sont recrutées lors de la réponse fibrotique caractérisant le modèle de constriction aortique supra-rénale (81). Ainsi, nous avons réitéré les expériences de Zeisberg avec un marqueur plus adéquat des fibroblastes, soit le collagène  $\alpha_1$ . La nouveauté de ces recherches réside dans l'observation que la protéine nestine est un marqueur de l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules endothéliales dans un modèle de constriction aortique supra-rénale de deux semaines chez le rat.

## **CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

En conclusion, la fibrose réactive est un processus pathologique impliqué dans le remodelage cardiaque qui est secondaire à l'hypertension artérielle. La fibrose est caractérisée par la synthèse accrue du collagène qui est médiée par les myofibroblastes. Plusieurs études ont démontré que le filament intermédiaire nestine est ré-exprimé dans les myofibroblastes durant la fibrose réparative suivant un infarctus du myocarde et qu'il est impliqué dans la prolifération cellulaire des myofibroblastes. De plus, il a été démontré que la prolifération des fibroblastes résidents et la transition des cellules endothéliales contribuent à l'apparition des myofibroblastes lors de la fibrose réparative. La présente étude a permis de démontrer que la protéine nestine est augmentée de manière significative dans le cœur hypertendu de façon corrélative avec la PAM et la PSVG. Plus précisément, l'augmentation de la protéine nestine a été détectée dans la zone fibrotique interstitielle et péri-vasculaire du cœur hypertendu dans une sous-population de cellules mésenchymateuses positives à l'expression de collagène  $\alpha_1$ . Par ailleurs, nous avons démontré qu'il était possible d'induire la protéine nestine dans les fibroblastes normaux et hypertendus suite à l'exposition de ces cellules aux facteurs pro-fibrotiques AII, TGF- $\beta_1$  et EGF présents dans plusieurs pathologies. La présence de la protéine nestine a ensuite été détectée dans une sous-population de cellules endothéliales CD31<sup>(+)</sup>, déplacées dans la zone vasculaire des vaisseaux dont l'intégrité est corrompue, qui sont positives à l'expression de collagène  $\alpha_1$ . La co-expression de ces marqueurs suggère que les cellules endothéliales subissent un changement de phénotype afin d'acquérir un phénotype mésenchymateux. Par la suite, nous avons confirmé ces observations *in vitro* avec des cellules provenant de vaisseaux sanguins de différents calibres dans le cœur. Les cellules endothéliales microvasculaires de rats sécrètent le collagène au niveau basal, alors que l'expression de nestine est faible ou absente. Suivant un traitement avec le TGF- $\beta_1$ , l'expression de nestine est induite sous sa forme non-filamenteuse dans ces cellules, alors qu'aucun changement n'est perçu dans l'expression de collagène. Par contraste, les cellules endothéliales d'artères coronaires humaines expriment au niveau basal la protéine nestine, sous sa forme filamenteuse, alors que l'expression de collagène  $\alpha_1$  est absente. Suite au traitement de 72 heures avec le TGF- $\beta_1$ , les cellules acquièrent un phénotype mésenchymateux caractérisé par la synthèse de collagène  $\alpha_1$ , alors que l'expression de nestine est toujours visible sous sa forme filamenteuse.

Collectivement, ces données supportent la prémisse selon laquelle la réponse de fibrose réactive, dans les cœurs hypertrophiés après une CAS, est attribuée en partie à l'augmentation de l'apparition des cellules mésenchymateuses nestine<sup>(+)</sup>, qui proviennent des fibroblastes résidents du ventricule. De plus, les données *in vivo* et *in vitro*, suggèrent que les cellules endothéliales déplacées représentent une source additionnelle des cellules mésenchymateuses nestine<sup>(+)</sup> dans le cœur hypertrophié et contribuent au développement de la fibrose réactive. Le fait de cibler la protéine nestine peut représenter une approche thérapeutique afin d'atténuer la réponse de fibrose réactive indépendamment de l'origine des cellules mésenchymateuses.

D'un point de vue intégratif, il serait intéressant d'examiner la relation entre la protéine nestine et l'EndMT, dans une pathologie d'infarctus du myocarde chez les patients diabétique. Dans la littérature, il est démontré que le processus d'EndMT peut contribuer à la formation de la cicatrice, aussi connu sous le nom de fibrose réparative, qui survient après un infarctus du myocarde. La contribution de ce processus fournit une source supplémentaire de myofibroblastes qui sont recrutés dans le dépôt de collagène dans la zone infarctée. Il est démontré que plusieurs complications surviennent suite à un infarctus du myocarde chez les patients diabétiques. Parmi les complications, nous retrouvons la formation inadéquate de la cicatrice cardiaque, qui implique une diminution de l'angiogenèse, une diminution de la fibrose réparative, une cicatrice plus mince et une dilation plus importante de la cavité du ventricule. Le processus de fibrose réactive qui caractérise la formation de la cicatrice est altéré par un faible taux d'angiogenèse chez les patients diabétiques, il est donc légitime de se demander si le processus d'EndMT est entravé conséquemment à la diminution d'angiogenèse. La diminution de cellules endothéliales agissant à titre de substrat dans l'EndMT pourrait entraîner une diminution de l'apparition des myofibroblastes et par conséquent une formation inadéquate de la cicatrice. Comme il a été démontré que la protéine nestine est diminuée de façon significative des modèles expérimentaux de diabète de type 1 et de type 2 chez le rat, on peut se questionner sur le rôle de la protéine nestine dans le processus d'EndMT. Cette corrélation négative demeure pour le moment inexplicée, mais pourrait nous fournir une compréhension intégrative du rôle de la protéine nestine dans les conditions pathologiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Gouvernement du Canada SC. 2014. *Principales causes de décès, selon le sexe (Les deux sexes)*. <http://www.statcan.gc.ca/tables-tableaux/sum-som/102/cst01/hlth36a-fra.htm>
2. *Statistiques - - Fondation des maladies du coeur et de l'AVC - QC*. heartandstroke.ca. <http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kpIQKVOxFoG/b.3669917/k.9F47/Statistiques.htm>
3. *Maladies du coeur - Problèmes de santé cardiovasculaires - - Fondation des maladies du coeur et de l'AVC - QC*. heartandstroke.ca. [http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kpIQKVOxFoG/b.3669867/k.953A/Maladies\\_du\\_coeur\\_\\_\\_Probl232mes\\_de\\_sant233\\_cardiovasculaires.htm](http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kpIQKVOxFoG/b.3669867/k.953A/Maladies_du_coeur___Probl232mes_de_sant233_cardiovasculaires.htm)
4. *Maladies du coeur - Problèmes de santé qui affectent le fonctionnement du cœur - - Fondation des maladies du cœur et de l'AVC*. heartandstroke.ca. [http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3579677/k.F5EA/Maladies\\_du\\_coeur\\_\\_\\_Probl232mes\\_de\\_sant233\\_qui\\_affectent\\_le\\_fonctionnement\\_du\\_c339ur.htm](http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3579677/k.F5EA/Maladies_du_coeur___Probl232mes_de_sant233_qui_affectent_le_fonctionnement_du_c339ur.htm)
5. Izzo JL, Henry R Black, Goodfriend TL, Council for High Blood Pressure Research. 1999. *Hypertension primer : the essentials of high blood pressure*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. xxiii+471 pp. 2nd ed.. ed.
6. Eckel RH, Krauss RM, Committee for the AN. 1998. American heart association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *Circulation*. 97(21):2099–2100
7. *Maladies du coeur - Prévention des maladies du cœur et des facteurs de risques - - Fondation des maladies du coeur et de l'AVC - QC*. heartandstroke.ca.

[http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kpIQKVOxFoG/b.3669863/k.5F42/Maladies\\_du\\_coeur\\_\\_Pr233vention\\_des\\_maladies\\_du\\_c339ur\\_et\\_des\\_facteurs\\_de\\_risques.htm](http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kpIQKVOxFoG/b.3669863/k.5F42/Maladies_du_coeur__Pr233vention_des_maladies_du_c339ur_et_des_facteurs_de_risques.htm)

8. Preiss D, Kristensen SL. The new pooled cohort equations risk calculator. *Can. J. Cardiol.*
9. Guyton AC. 1996. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia ; Montreal: WBSaunders. xliii+1148 pp. 9th ed.. ed.
10. Marieb EN. 2010. *Anatomie et physiologie humaines*. Saint-Laurent, Québec: Éditions du Renouveau pédagogique. 118 pp. 4e éd.. ed.
11. Katz AM. 2011. *Physiology of the heart*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health. xv+576 pp. 5th ed.. ed.
12. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 293(3):H1883–91
13. Iaizzo PA, SpringerLink. 2009. *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices*. New York, NY: Springer. 2nd ed.. ed.
14. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. 2006. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1080(1):76–84
15. Fernandez-Madrid F, Noonan S, Riddle J. 1981. The “spindle-shaped” body in fibroblasts: intracellular collagen fibrils. *J. Anat.* 132(Pt 2):157–66
16. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 65(1):40–51
17. Bosman FT, Stamenkovic I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200(4):423–28



18. Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. 2009. Cardiac fibroblast the renaissance cell. *Circ. Res.* 105(12):1164–76
19. Jugdutt BI. 2003. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 3(1):1–30
20. Swynghedauw B. 1995. *Molecular Cardiology for the Cardiologists*. Boston, MA: Springer US
21. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 225(3):631–37
22. Villarreal FJ. 2005. *Interstitial fibrosis in heart failure*. New York: Springer
23. Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. 2009. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ. Res.* 105(10):934–47
24. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, et al. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: fsp1. *J. Cell Biol.* 130(2):393–405
25. Chen W, Frangogiannis NG. 2013. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833(4):945–53
26. Kong P, Christia P, Saxena A, Su Y, Frangogiannis NG. 2013. Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 305(9):H1363–72
27. Immunocytochemical studies of endothelial cells in vivo. i. the presence of desmin only, or of desmin plus vimentin, or vimentin only, in the endothelial cells of different capillaries of the adult chicken. 1986. *J. Cell Biol.* 103(6):2775–86

28. Jurisic G, Iolyeva M, Proulx ST, Halin C, Detmar M. 2010. Thymus cell antigen 1 (thy1, cd90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Exp. Cell Res.* 316(17):2982–92
29. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, Zambon AC, Kisseleva T, et al. 2014. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *J. Clin. Invest.* 124(7):2921–34
30. Santiago J-J, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, et al. 2010. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev. Dyn.* 239(6):1573–84
31. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(5):349–63
32. Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. 2013. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat. Rev. Cardiol.* 10(1):15–26
33. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. 2002. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension.* 39(2):258–63
34. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. 2003. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the jnc 7 report. *JAMA.* 289(19):2560–71

35. WHO | *Raised blood pressure*. WHO.  
[http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/blood\\_pressure\\_prevalence\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/)
36. Gouvernement du Canada SC. 2014. *Hypertension artérielle, 2013*.  
<http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2014001/article/14020-fra.htm>
37. Carretero OA, Oparil S. 2000. Essential hypertension part i: definition and etiology. *Circulation*. 101(3):329–35
38. Gerard J. Tortora. 2009. *Principles of anatomy and physiology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 75 pp. 12th ed.. ed.
39. Izzo JL, Henry R Black, Goodfriend TL, Council for High Blood Pressure Research. 1999. *Hypertension primer : the essentials of high blood pressure*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. xxiii+471 pp. 2nd ed.. ed.
40. Weber KT, Brilla CG. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 83(6):1849–65
41. Urata H, Nishimura H, Ganten D. 1996. Chymase-dependent angiotensin ii forming system in humans. *Am. J. Hypertens*. 9(3):277–84
42. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, et al. 1994. Cardiac renin and angiotensins. uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*. 24(1):37–48
43. Falkenhahn M, Franke F, Bohle RM, Zhu Y-C, Stauss HM, et al. 1995. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension*. 25(2):219–26

44. Rogers TB, Gaa ST, Allen IS. 1986. Identification and characterization of functional angiotensin ii receptors on cultured heart myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236(2):438–44
45. Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. 1994. Characterization of angiotensin ii receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. coupling to signaling systems and gene expression. *J. Clin. Invest.* 93(6):2372–78
46. De Carvalho Frimm C, Sun Y, Weber KT. 1997. Angiotensin ii receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart. *J. Lab. Clin. Med.* 129(4):439–46
47. Dzau VJ. 1993. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch. Intern. Med.* 153(8):937–42
48. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* 56(1):56–64
49. Holubarsch C, Ruf T, Goldstein DJ, Ashton RC, Nickl W, et al. 1996. Existence of the frank-starling mechanism in the failing human heart. investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels. *Circulation.* 94(4):683–89
50. Lakatta EG. 1987. Starling's law of the heart is explained by an intimate interaction of muscle length and myofilament calcium activation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 10(5):1157–64
51. Frohlich ED. 1999. Risk mechanisms in hypertensive heart disease. *Hypertension.* 34(4):782–89
52. Lorell BH, Carabello BA. 2000. Left ventricular hypertrophy pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 102(4):470–79

53. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. 1989. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ. Res.* 64(6):1041–50
54. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. 2001. Angiotensin ii type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin ii–induced hypertension. *Circulation.* 104(3):346–51
55. Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, et al. 2009. Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ. Res.* 105(12):1213–22
56. Aguilar M, Qi XY, Huang H, Comtois P, Nattel S. 2014. Fibroblast electrical remodeling in heart failure and potential effects on atrial fibrillation. *Biophys. J.* 107(10):2444–55
57. Comtois P, Nattel S. 2011. Interactions between cardiac fibrosis spatial pattern and ionic remodeling on electrical wave propagation. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 2011:4669–72
58. Ghosh AK, Nagpal V, Covington JW, Michaels MA, Vaughan DE. 2012. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (endmt): differential expression of micrnas during endmt. *Cell. Signal.* 24(5):1031–36
59. Lin F, Wang N, Zhang T-C. 2012. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. *IUBMB Life.* 64(9):717–23
60. Eisenberg LM, Markwald RR. 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* 77(1):1–6

61. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67(21):10123–28
62. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, et al. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13(8):952–61
63. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. 2011. Role of endothelial-mesenchymal transition (endomt) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am. J. Pathol.* 179(3):1074–80
64. Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119(6):1420–28
65. Medici D, Kalluri R. 2012. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin. Cancer Biol.* 22(5-6):379–84
66. Massagué J. 2000. How cells read tgf-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1(3):169–78
67. Nawshad A, Medici D, Liu C-C, Hay ED. 2007. Tgfbeta3 inhibits e-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a smad2-smad4-lef1 transcription complex. *J. Cell Sci.* 120(Pt 9):1646–53
68. Medici D, Hay ED, Goodenough DA. 2006. Cooperation between snail and lef-1 transcription factors is essential for tgf-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell.* 17(4):1871–79
69. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. 2008. Snail is required for tgf-beta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Sci.* 121(Pt 20):3317–24

70. Medici D, Potenta S, Kalluri R. 2011. Transforming growth factor- $\beta$ 2 promotes snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of smad-dependent and smad-independent signalling. *Biochem. J.* 437(3):515–20
71. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. 2008. Snail is required for tgfbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Sci.* 121(Pt 20):3317–24
72. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. 2007. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 293(1):L1–8
73. Nagai T, Kanasaki M, Srivastava SP, Nakamura Y, Ishigaki Y, et al. 2014. N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits diabetes-associated kidney fibrosis and endothelial-mesenchymal transition. *BioMed Res. Int.* 2014:696475
74. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* 119(6):1438–49
75. Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112(12):1776–84
76. Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2(6):442–54
77. Nakajima Y, Miyazono K, Kato M, Takase M, Yamagishi T, Nakamura H. 1997. Extracellular fibrillar structure of latent tgfbeta binding protein-1: role in tgfbeta-dependent endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion tissue formation in mouse embryonic heart. *J. Cell Biol.* 136(1):193–204

78. Eisenberg LM, Markwald RR. 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* 77(1):1–6
79. Akhurst RJ, Lehnert SA, Faissner A, Duffie E. 1990. Tgf beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 108(4):645–56
80. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 19(12):2282–87
81. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, et al. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13(8):952–61
82. Okayama K, Azuma J, Dosaka N, Iekushi K, Sanada F, et al. 2012. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition. *Hypertension.* 59(5):958–65
83. Kizu A, Medici D, Kalluri R. 2009. Endothelial–mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.* 175(4):1371–73
84. Zhu P, Huang L, Ge X, Yan F, Wu R, Ao Q. 2006. Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Int. J. Exp. Pathol.* 87(6):463–74
85. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. 2007. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293(1):L1–8



86. Lee JG, Kay EP. 2006. Fgf-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 83(6):1309–16
87. Xing F, Saidou J, Watabe K. 2010. Cancer associated fibroblasts (cafs) in tumor microenvironment. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 15:166–79
88. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. 2008. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br. J. Cancer.* 99(9):1375–79
89. Xiao L, Kim DJ, Davis CL, McCann JV, Dunleavey JM, et al. 2015. Tumor endothelial cells with distinct patterns of tgfb $\beta$ -driven endothelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 75(7):1244–54
90. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. 2012. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 5(1):15
91. Yoshimatsu Y, Watabe T. 2011. Roles of tgfb $\beta$  signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis. *Int. J. Inflamm.* 2011:724080
92. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. Cns stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 60(4):585–95
93. Hockfield S, McKay RD. 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 5(12):3310–28
94. K M, M Z. 2005. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* 20(2):665–71
95. Chou Y-H, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD. 2003. Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 14(4):1468–78

96. Sjöberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T. 1994. Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp. Cell Res.* 214(2):447–58
97. Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD. 1998. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J. Cell Sci.* 111 ( Pt 14):1951–61
98. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. 1992. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 2):589–97
99. Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, et al. 1994. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron.* 12(1):11–24
100. Lothian C, Prakash N, Lendahl U, Wahlström GM. 1999. Identification of both general and region-specific embryonic cns enhancer elements in the nestin promoter. *Exp. Cell Res.* 248(2):509–19
101. Calderone A. 2012. Nestin+ cells and healing the infarcted heart. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 302(1):H1–9
102. Cattaneo E, McKay R. 1990. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature.* 347(6295):762–65
103. Selander L, Edlund H. 2002. Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech. Dev.* 113(2):189–92
104. Yang J, Bian W, Gao X, Chen L, Jing N. 2000. Nestin expression during mouse eye and lens development. *Mech. Dev.* 94(1–2):287–91

105. Chen J, Boyle S, Zhao M, Su W, Takahashi K, et al. 2006. Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17(5):1283–91
106. C T, A R, Ta M, K F, U L, J W. 1995. Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int. J. Dev. Biol.* 39(6):947–56
107. Sejersen T, Lendahl U. 1993. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell Sci.* 106(4):1291–1300
108. Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. 1995. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J. Histochem. Cytochem.* 43(8):843–47
109. Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, et al. 2005. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J. Cell. Physiol.* 204(1):51–62
110. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, et al. 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes.* 50(3):521–33
111. Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, et al. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 23(3):373–82
112. Turksen K. 2004. *Adult stem cells*. Totowa, NJ: Humana Press. xiii+346 pp.
113. Jiang MH, Li G, Liu J, Liu L, Wu B, et al. 2015. Nestin(+) kidney resident mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney ischemia injury. *Biomaterials.* 50:56–66

114. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, et al. 2003. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(17):9958–61
115. Yamada H, Takano T, Ito Y, Matsuzuka F, Miya A, et al. 2009. Expression of nestin mrna is a differentiation marker in thyroid tumors. *Cancer Lett.* 280(1):61–64
116. Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K, Uchida E, Korc M, et al. 2009. Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Hum. Pathol.* 40(2):189–98
117. Lobo MVT, Arenas MI, Alonso FJM, Gomez G, Bazán E, et al. 2004. Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell Tissue Res.* 316(3):369–76
118. Li H, Cherukuri P, Li N, Cowling V, Spinella M, et al. 2007. Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res.* 67(2):501–10
119. Sarlomo-Rikala M, Tsujimura T, Lendahl U, Miettinen M. 2002. Patterns of nestin and other intermediate filament expression distinguish between gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas\*. *APMIS.* 110(6):499–507
120. Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, et al. 2001. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* 276(19):16456–63
121. Mimeault M, Batra SK. 2008. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev.* 4(1):27–49

122. Krupkova O, Loja T, Zambo I, Veselska R. 2010. Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma*. 57(4):291–98
123. Béguin PC, Gosselin H, Mamarbachi M, Calderone A. 2012. Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts. *J. Cell. Physiol*. 227(2):813–20
124. El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, et al. 2005. Resident nestin+ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium. *Hypertension*. 46(5):1219–25
125. El-Helou V, Béguin PC, Assimakopoulos J, Clement R, Gosselin H, et al. 2008. The rat heart contains a neural stem cell population; role in sympathetic sprouting and angiogenesis. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 45(5):694–702
126. Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, et al. 2005. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J. Cell. Physiol*. 204(1):51–62
127. Béguin PC, El-Helou V, Gillis M-A, Duquette N, Gosselin H, et al. 2011. Nestin (+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart. *J. Cell. Physiol*. 226(5):1157–65
128. Béguin PC, El-Helou V, Assimakopoulos J, Clément R, Gosselin H, et al. 2009. The phenotype and potential origin of nestin+ cardiac myocyte-like cells following infarction. *J. Appl. Physiol*. 107(4):1241–48
129. Yang XH, Wu QL, Yu XB, Xu CX, Ma BF, et al. 2008. Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *J. Clin. Pathol*. 61(4):467–73

130. Liu C, Chen B, Zhu J, Zhang R, Yao F, et al. 2010. Clinical implications for nestin protein expression in breast cancer. *Cancer Sci.* 101(3):815–19
131. Ryuge S, Sato Y, Wang GQ, Matsumoto T, Jiang SX, et al. 2011. Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer. *Chest.* 139(4):862–69
132. Milde T, Hielscher T, Witt H, Kool M, Mack SC, et al. 2012. Nestin expression identifies ependymoma patients with poor outcome. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 22(6):848–60
133. Association of nestin with aggressive histologic features and poor endometrial cancer patient outcome. *J. Clin. Oncol.*
134. Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. 2014. Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 44(4):1118–30
135. Hyder C. 2014. Tuning cell motility : roles of nestin and vimentin in cancer cell invasion and motility
136. Hagio M, Matsuda Y, Suzuki T, Ishiwata T. 2013. Nestin regulates epithelial-mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Mol. Clin. Oncol.* 1(1):83–87
137. Su H-T, Weng C-C, Hsiao P-J, Chen L-H, Kuo T-L, et al. 2013. Stem cell marker nestin is critical for tgf- $\beta$ 1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res. MCR.* 11(7):768–79
138. Liu J-K, Chen W-C, Ji X-Z, Zheng W-H, Han W, An J. 2015. Correlation of overexpression of nestin with expression of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in gastric adenocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP.* 16(7):2777–83

139. Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M, et al. 2007. Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int.* 72(3):307–18
140. You S, Avidan O, Tariq A, Ahluwalia I, Stark PC, et al. 2012. Role of epithelial-mesenchymal transition in repair of the lacrimal gland after experimentally induced injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53(1):126–35
141. Yang J, Velikoff M, Canalis E, Horowitz JC, Kim KK. 2014. Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through autocrine and paracrine secretion of connective tissue growth factor. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 306(8):L786–96
142. Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer P-J, Botturi K, et al. 2014. Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 23(131):118–30
143. Kage H, Borok Z. 2012. Emt and interstitial lung disease: a mysterious relationship. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 18(5):517–23
144. Hasenfuss G. 1998. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 39(1):60–76
145. Cho JS, Cho EJ, Lee J, Choi H-D, Park KC, et al. 2014. Myocardial mechanics in a rat model with banding and debanding of the ascending aorta. *J. Cardiovasc. Ultrasound.* 22(4):189–95
146. Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, et al. 1988. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 22(10):686–95

147. El-Helou V, Gosselin H, Villeneuve L, Calderone A. 2012. The plating of rat scar myofibroblasts on matrigel unmasks a novel phenotype; the self assembly of lumen-like structures. *J. Cell. Biochem.* 113(7):2442–50
148. Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119(6):1420–28
149. Hasenfuss G. 1998. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 39(1):60–76
150. Doggrell SA, Brown L. 1998. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 39(1):89–105
151. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. 1990. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol.* 259(2 Pt 2):H324–32
152. Sadoshima J, Izumo S. 1993. Molecular characterization of angiotensin ii--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. critical role of the at1 receptor subtype. *Circ. Res.* 73(3):413–23
153. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. 1990. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 259(2):H324–32
154. Liu W, Zhang Y, Hao J, Liu S, Liu Q, et al. 2012. Nestin protects mouse podocytes against high glucose-induced apoptosis by a cdk5-dependent mechanism. *J. Cell. Biochem.* 113(10):3186–96
155. Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di C-G, et al. 2010. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 28(12):2162–71



156. Liu J, Ji X, Li Z, Zheng H, Zheng W, et al. 2015. Nestin overexpression promotes the embryonic development of heart and brain through the regulation of cell proliferation. *Brain Res.* 1610:1–11
157. Mokry J, Pudil R, Ehrmann J, Cizkova D, Osterreicher J, et al. 2008. Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 453(1):33–41
158. Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, et al. 1999. Class vi intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology. Baltim. Md.* 29(2):520–27
159. Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. 1995. Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J. Cell Biol.* 131(2):453–64
160. Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Hurme T, Rantanen J, et al. 2001. The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60(6):588–97
161. Sahlgren CM, Pallari H-M, He T, Chou Y-H, Goldman RD, Eriksson JE. 2006. A nestin scaffold links cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J.* 25(20):4808–19
162. Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, et al. 2005. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J. Cell. Physiol.* 204(1):51–62

163. Béguin PC, El-Helou V, Assimakopoulos J, Clément R, Gosselin H, et al. 2009. The phenotype and potential origin of nestin<sup>+</sup> cardiac myocyte-like cells following infarction. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 107(4):1241–48
164. Scobioala S, Klocke R, Kuhlmann M, Tian W, Hasib L, et al. 2008. Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22(4):1021–31
165. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, et al. 2005. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J. Cell Biol.* 170(7):1135–46
166. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms.* 2014. Elsevier. 4376 pp.
167. Vanstherthem D, Gossiaux A, Declèves A-E, Caron N, Nonclercq D, et al. 2010. Expression of nestin, vimentin, and ncam by renal interstitial cells after ischemic tubular injury. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:193259
168. Dugina V, Alexandrova A, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. 1998. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in  $\alpha$ -smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization. *Exp. Cell Res.* 238(2):481–90
169. Maragoudakis ME. 1998. *Angiogenesis: Models, Modulators, and Clinical Applications.* Springer Science & Business Media. 588 pp.

