

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Ecole Doctorale Des Génomes Aux Organismes

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Spécialité

Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Validation de méthodes de transfert de cellules souches
embryonnaires humaines pour la thérapie de la cardiomyopathie
associée à la Dystrophie Musculaire de Duchenne**

Présentée par

Séverine Pouillot

Composition du jury :

M. le Professeur Francis Quétier (Président du jury)

Mme le Professeur Annelise Bennaceur-Griscelli (Rapporteur)

M. le Professeur Alain Berdeaux (Rapporteur)

M. le Docteur Otto-Wilhelm Merten (Examineur)

Mme le Docteur Christelle Monville (Co-Directeur de thèse)

M. le Docteur Marc Peschanski (Directeur de thèse)

Table des matières

<i>Avant-propos</i>	3
<i>Revue Bibliographique</i>	6
1. Les cellules souches embryonnaires	7
1.1 Les cellules souches adultes.....	8
1.1.1 Les différents types de cellules souches adultes	8
1.1.2 Les applications.....	11
1.1.3 Les limites	11
Notion de plasticité.....	11
Problèmes pour isoler, identifier et caractériser les cellules souches adultes	12
1.2 Définition et propriétés des cellules souches embryonnaires humaines (hES).....	13
1.2.1 Historique	13
1.2.2 L'état indifférencié.....	15
1.2.3 La différenciation	19
1.3 Utiliser les cellules souches embryonnaires.....	21
1.3.1 Sources	22
1.3.2 Applications biomédicales	22
1.3.3 Les limites	24
1.4 Une alternative : La reprogrammation cellulaire et les cellules souches pluripotentes induites (iPS, induced pluripotent cells)	33
2 La thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque associée à la myopathie de Duchenne	37
2.1. L'insuffisance cardiaque associée à la DMD.....	37
2.1.1. La cardiomyopathie associée à la Dystrophie Musculaire de Duchenne	37
2.1.2. Modèles DMD.....	38
2.2. La thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque.....	39
2.2.1. Les modèles d'étude pour la thérapie cellulaire cardiaque	39
2.2.2 Les essais de thérapie cellulaire avec les cellules souches adultes	40
2.3. Utilisation des cellules souches embryonnaires pour la thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque.....	46
2.3.1 Connaissances sur le développement embryonnaire du cœur	47
2.3.2 Les protocoles de différenciation guidée	51
2.3.3 Les limites	54
2.4 Tissue engineering.....	55
<i>Résultats</i>	58
1 ^{ère} partie: Mise au point d'un modèle organotypique battant de cœur : applications à la thérapie cellulaire et l'étude fonctionnelle de composés pharmacologiques	59
1 Objectif de l'étude	59
2 Principaux résultats	59
La différenciation des cellules hES en cardiomyocytes après transplantation dans les tranches.....	60
Les tranches de cœur montrent des contractions spontanées pendant plusieurs mois de culture.....	61
Les cultures organotypiques de tranche de cœur humain à l'interface air-milieu sur des membranes semi-poreuses.....	62
3. Interprétation des résultats	62
2 ^{ème} partie: optimisation des protocoles d'obtention des cellules cardiaques pour la thérapie	63
1. Objectif de l'étude	63
2. Principaux résultats	63

1. Evaluation du potentiel cardiogénique des lignées SA01 et VUB01	63
2. Optimisation des protocoles d'obtention des cardiomyocytes	64
2.1. Effet de l'induction des cellules hES par ajout de facteurs et/ou par co-culture sur cellules nourricières	64
2.2. Effet de la culture en bioréacteur sur la différenciation cardiaque	65
2.3. Etablissement d'une population triée sur l'expression de KDR	65
3. Interprétation des résultats	65
<i>Matériel et méthodes</i>	67
<i>Discussion</i>	74
Un modèle de culture organotypique	75
Un modèle histologiquement et fonctionnellement préservé	75
Un modèle d'étude de la transplantation de cellules hES	78
La culture en bioréacteur	80
<i>Conclusion-Perspectives</i>	83
<i>Bibliographie</i>	89

Avant-propos

Le sujet de ma thèse a été de valider et d'optimiser les méthodes de transfert de cardiomyocytes, dérivés *ex vivo* à partir de cellules souches embryonnaires humaines, dans le muscle cardiaque d'animaux modèles de la Dystrophie Musculaire de Duchenne.

La thérapie cellulaire ouvre des perspectives thérapeutiques nouvelles pour beaucoup de pathologies et la preuve de concept a déjà été rapportée cliniquement dans certains cas. Néanmoins, dans certains domaines, la source de cellules à injecter n'est pas encore accessible, notamment dans le domaine de la cardiologie.

Le cœur est un des organes possédant une capacité de régénération limitée et donc toute perte significative ou dysfonctionnement des cellules cardiaques peut entraîner une cardiopathie consécutive (Capi and Gepstein 2006). Dans le cadre particulier de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), l'absence de dystrophine entraîne la mort progressive des cellules musculaires et conduit, généralement à l'adolescence, à l'apparition de troubles cardiaques associés à une dilatation du ventricule gauche (McNally 2007). Pour ces patients dont l'état musculaire est très altéré, la greffe d'organe n'est pas concevable et les chercheurs doivent envisager de nouvelles thérapies. De nombreuses études ont démontré la faisabilité de la transplantation de cellules xénogéniques, allogéniques ou autologues dans le cœur de plusieurs espèces animales avec plus ou moins de succès (pour revue, Xiao 2003; Christoforou and Gearhart 2007). Parmi les cellules testées, les cellules souches, qui possèdent des capacités d'autorenouvellement et de pluripotence (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998), et qui peuvent se différencier en cardiomyocytes fonctionnels semblent posséder les meilleures qualités pour ce type de thérapie (He, Ma et al. 2003; Mummery, Ward-van Oostwaard et al. 2003; Tomescot, Leschik et al. 2007).

C'est dans ce cadre que j'ai initié mon projet de thèse, dès la création d'I-Stem en janvier 2005, alors que les essais de thérapie cellulaire cardiaque avec des cellules souches embryonnaires humaines n'en étaient qu'à leurs prémises. La vocation d'Istem -Institut des cellules Souches pour la Thérapie Et le traitement des maladies Monogéniques- est d'exploiter le potentiel thérapeutique des cellules souches embryonnaires pour l'appliquer aux maladies monogéniques.

Lorsque j'ai débuté ce travail de thèse il n'existait pas de modèle *in vitro* au long cours pour une recherche sur l'implantation de cellules cardiaques, comme cela est le cas par exemple pour le cerveau. En effet, les cultures organotypiques de cœur, décrites jusque là, n'avaient pas été maintenues au-delà de deux semaines (Pillekamp, Reppel et al. 2006). Nous avons tenté de répondre à la question en nous fondant sur les techniques développées avec

succès au laboratoire, en utilisant le modèle organotypique de tranches de cerveau qui permet d'éviter de submerger les tissus sous le milieu en créant un système de diffusion latérale.

Après une introduction générale sur les différents types de cellules souches, je présenterai les données de la littérature qui permettent de donner tous les éléments nécessaires à la compréhension de l'étude expérimentale que j'ai menée pour :

- dans un premier temps, établir un modèle permettant de savoir si les cellules hES s'intègrent vraiment dans le muscle cardiaque, et comment cette intégration anatomique et fonctionnelle peut être améliorée.
- dans un deuxième temps, optimiser les protocoles d'obtention, *in vitro*, de cardiomyocytes ou progéniteurs cardiaques.

J'exposerai ensuite les résultats qui présentent le modèle organotypique de tranches de cœurs de rat nouveau-né que nous avons développé. Les tranches obtenues battent pendant plusieurs semaines, présentent une intégrité tissulaire préservée et une réactivité à la présence de drogues dans le milieu. De plus, nous avons pu observer qu'un certain nombre d'interactions matrice-cellule sont conservées. Lorsque les cellules sont injectées dans ces tranches, elles sont retrouvées après plusieurs semaines, engagées dans la voie mésodermique et même dans la voie cardiaque (Habeler, Pouillot et al., sous presse, figure en annexe).

En parallèle, nous avons exploité les ressources de cellules hES disponibles au laboratoire pour leur potentiel cardiogénique. Nous avons différencié les deux lignées testées et obtenu des cardiomyocytes battants. Plusieurs aspects du protocole ont été améliorés dans le but d'obtenir une population homogène de cellules qui puissent être amplifiables et différenciables. J'ai pu montrer que l'application de facteurs de croissance permet d'orienter les cellules hES vers une population cardiaque et que leur culture en bioréacteur, qui permet aux cellules d'évoluer en microgravité, améliore l'agrégation et synchronise les cellules, ce qui représente une première étape vers l'obtention d'une population homogène.

Revue Bibliographique

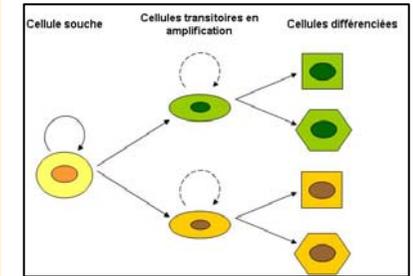
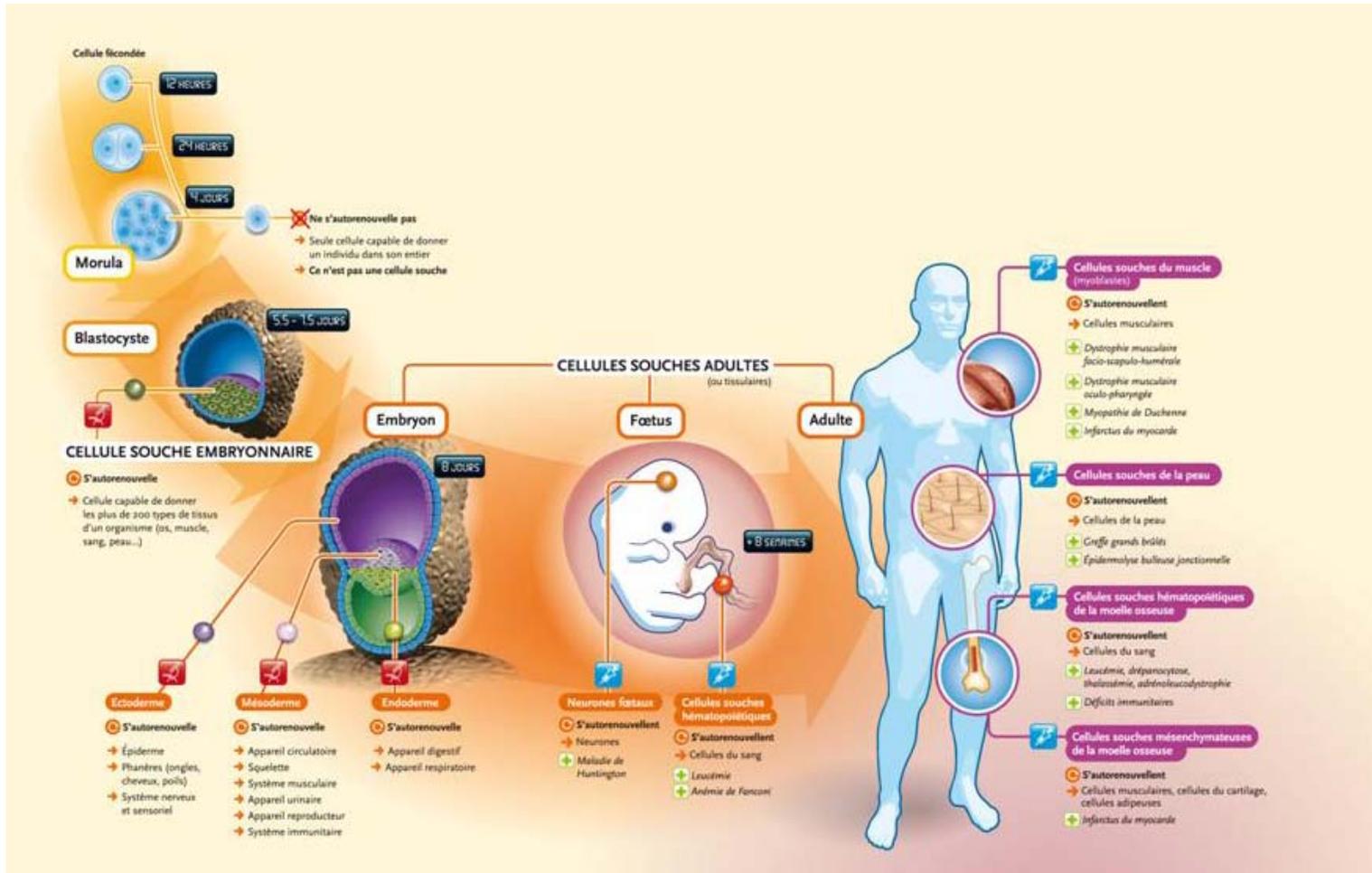


Figure I2 : Schéma résumant le principe d'autorenouvellement et de différenciation des cellules souches

Les cellules souches s'autorenouvellent et se différencient pour donner des cellules transitoires qui continuent à s'amplifier et donner des cellules complètement différenciées. Les cellules « rondes » sont souches, les carrées et hexagonales sont engagées dans différentes voies de différenciation.

Figure I1 : Schéma représentant les différentes cellules utilisées pour la thérapie cellulaire

Source : AFM

1. Les cellules souches embryonnaires

En biologie, le terme de cellules souches désigne des cellules indifférenciées qui, d'une part, peuvent donner des cellules spécialisées (différenciation) et, d'autre part, peuvent se renouveler indéfiniment (auto-renouvellement).

Si on classe les cellules souches en fonction de leur potentialité, apparaissent en premier les cellules totipotentes à partir desquelles on peut reconstituer un être humain (**Figure I1**). Ce sont les cellules de l'embryon des premières divisions de l'ovule fécondé. Plus tard dans le développement, apparaissent les cellules hES, pluripotentes, qui ont vocation à former tous les tissus de l'organisme mais ne peuvent aboutir à la création d'un individu complet. Puis, on trouve les cellules multipotentes et unipotentes, présentes dans l'organisme fœtal et adulte, et à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées pour les premières, alors que les cellules souches unipotentes ne peuvent former qu'une sorte de cellules différenciées. Les cellules primordiales germinales appartiennent à la lignée cellulaire qui formera les ovules et les spermatozoïdes.

Les cellules souches ont la capacité de s'auto-renouveler et/ou de donner naissance à une cellule différenciée: une des cellules filles devient une cellule souche en tous points comparable à sa cellule mère ; l'autre, par effet d'un message biologique provenant du tissu, se différencie en une cellule tissulaire spécialisée (**Figure I2**). C'est du tissu que viennent les messages de différenciation, quelle que soit la nature de la cellule souche. C'est cette propriété de division asymétrique des cellules souches qui est à l'origine du concept de réparation d'un tissu, ou du maintien numérique d'une population cellulaire organique ou tissulaire chez un individu adulte. À partir de ce concept de régénération tissulaire ou organique, est apparu celui de thérapie cellulaire par dépôt, au niveau de la lésion tissulaire, d'un contingent de cellules souches. Des recherches sont actuellement menées sur les mécanismes de communication intercellulaire, ainsi que sur les mécanismes de différenciation puis de spécialisation cellulaire, sur les conditions d'obtention des cellules souches, de leur mise en culture, de leur prolifération, et de leur administration locale ou systémique. Ces travaux reposent sur l'idée qu'en maîtrisant leur potentiel régénérateur, de nombreuses applications thérapeutiques majeures pourraient voir le jour et permettraient des réparations tissulaires et organiques potentiellement vitales. C'est le fondement de la médecine régénératrice (Fagniez, 2006).

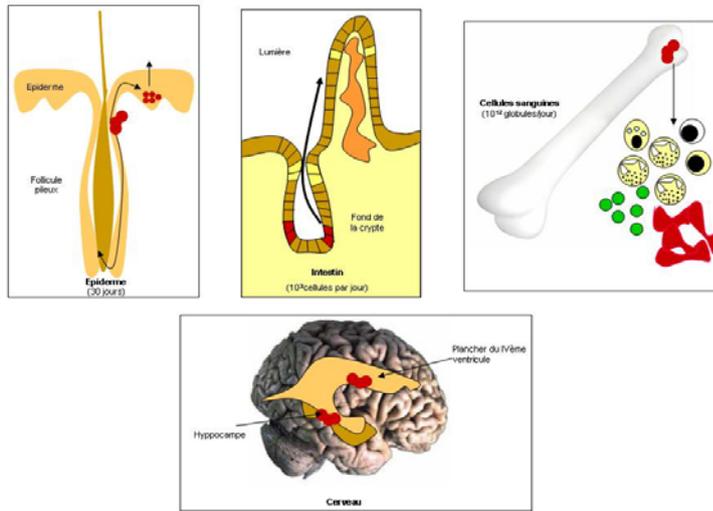


Figure I3 : Localisation anatomique des cellules souches dans les différents tissus de l'organisme (d'après Coulombel, 2003)

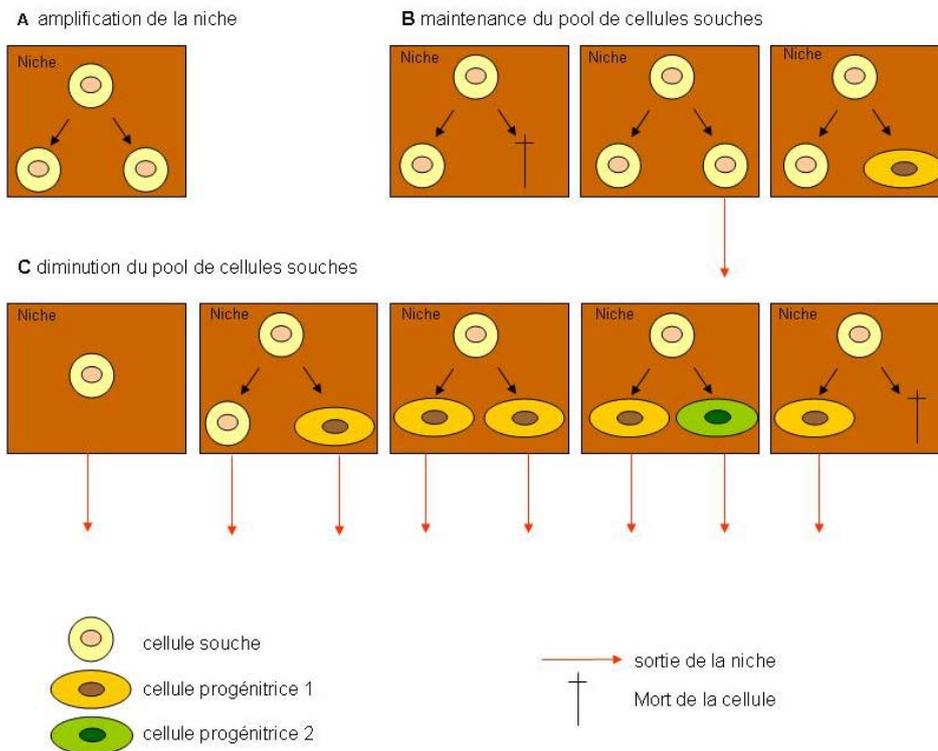


Figure I4 : Devenir schématique des cellules souches se divisant au sein des niches (d'après Gambardella et Barrandon 2003)

Les cellules souches peuvent se diviser de manière symétrique ou asymétrique. Les cellules filles peuvent donc être soit des cellules souches ou des cellules progénitrices engagées. Les cellules filles restent ou quittent la niche. La combinaison de ces événements donne soit en (A) une amplification de la population de cellules souches de la niche, soit en (B) le maintien strict de la population de cellules souches ou en (C) la diminution de la population de cellules souches.

Depuis leur découverte en 1998, les cellules souches embryonnaires humaines ont suscité un intérêt croissant de par leur fort potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces propriétés sont partagées par l'ensemble des cellules souches, et même si les cellules souches adultes ont un potentiel réduit pour ces deux caractéristiques, elles ont été très utilisées dans de nombreux essais cliniques et les recherches sur les deux types de cellules souches ne sont pas exclusives.

1.1 Les cellules souches adultes

1.1.1 Les différents types de cellules souches adultes

L'existence des cellules souches adultes a été mise en évidence dès les années cinquante (Puceat 2005). Leur rôle est de maintenir l'homéostasie de certains organes en renouvelant les cellules de manière continue tout au long de la vie (cellules du sang, de la peau, des intestins) mais aussi de manière plus soutenue lors d'une lésion (régénération du muscle) (pour revue, Coulombel 2003), (**Figure I3**).

Les cellules souches résident dans des microenvironnements hautement régulés appelés niches qui leur permettent de maintenir un équilibre entre auto-renouvellement et différenciation (**Figure I4**). Ces microenvironnements sont maintenus par un dialogue constant entre les cellules souches et les cellules environnantes. La niche offre aux cellules souches une protection contre les stimuli de différenciation, d'apoptose, et tout autre signal qui pourrait perturber le maintien du stock. La niche évite aussi la surproduction qui pourrait mener au cancer (Moore and Lemischka 2006; Mitsiadis, Barrandon et al. 2007).

Nous pouvons citer quelques exemples connus de cellules souches adultes qui ont été utilisées dans des essais de thérapie cellulaire.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH):

Les CSH peuvent produire l'ensemble des lymphocytes et des cellules myéloïdes différenciées. Dans le système hématopoïétique, l'existence de cellules souches dans la moelle osseuse a été postulée avant même leur identification formelle, pour expliquer la production quotidienne de millions de cellules sanguines. C'est sur ce postulat que les greffes de moelle osseuse ont été proposées dans les années 1975, alors que les CSH n'ont été identifiées à l'échelon clonal que dix ans plus tard (Finsterer and Stollberger 2003).

Les cellules souches mésenchymateuses

Elles correspondent au tissu stromal de la moelle et sont à l'origine des cellules osseuses, cartilagineuses, stromales, adipocytaires et probablement musculaires. Leur multipotence a été prouvée à l'échelon unicellulaire (Pittenger, Mackay et al. 1999). Elles sont localisées dans la région périvasculaire de la moelle (Shi and Gronthos 2003).

Les cellules souches de sang de cordon ombilical

La première greffe mondiale a été réalisée en 1988 (Gluckman, Broxmeyer et al. 1989) et depuis, 6000 greffes ont été effectuées de par le monde. Ces cellules sont riches en cellules hématopoïétiques et présentent des avantages supplémentaires par rapport à l'utilisation de cellules extraites de la moelle : le prélèvement ne présente pas de contrainte ni de risque pour la mère et l'enfant, alors que le prélèvement de moelle nécessite une anesthésie générale. La congélation est possible et les cellules ont des propriétés de prolifération et d'expansion supérieures à celles des cellules issues de la moelle ou du sang périphérique. De plus, l'état immature des cellules réduit le risque de rejet immunitaire. En revanche, la petite taille des greffons ne permet pas de pouvoir traiter des adultes.

Les cellules souches épithéliales amniotiques

Ces cellules, dérivées de la membrane amniotique du placenta humain, expriment des marqueurs qui caractérisent le stade indifférencié (détaillés plus loin). *In vitro*, des dérivés des lignages des trois feuillets embryonnaires peuvent être obtenus. Cependant, les cellules épithéliales amniotiques n'expriment pas la télomérase, leur pluripotence n'a pas été démontrée *in vivo* et une controverse sévit quant à l'existence de ces cellules ainsi qu'à leur fonctionnalité *in vivo*.

Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont obtenues à partir de tissus fœtaux prélevés entre 5 et 9 semaines à la suite d'interruptions volontaires de grossesse. Elles présentent un intérêt thérapeutique, notamment en ce qui concerne les cellules souches des zones germinatives du système nerveux central (Vescovi, Gritti et al. 1999), dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson ou Huntington) (Bjorklund, Dunnett et al. 2003; Bachoud-Levi, Gaura et al. 2006; Dunnett and Rosser 2007). De même, des progéniteurs hépatiques fœtaux peuvent être isolés, proliférer *in vitro* et repeupler un foie après transplantation, ils représentent donc aussi un espoir thérapeutique (Weber, Delgado et al. 2006).

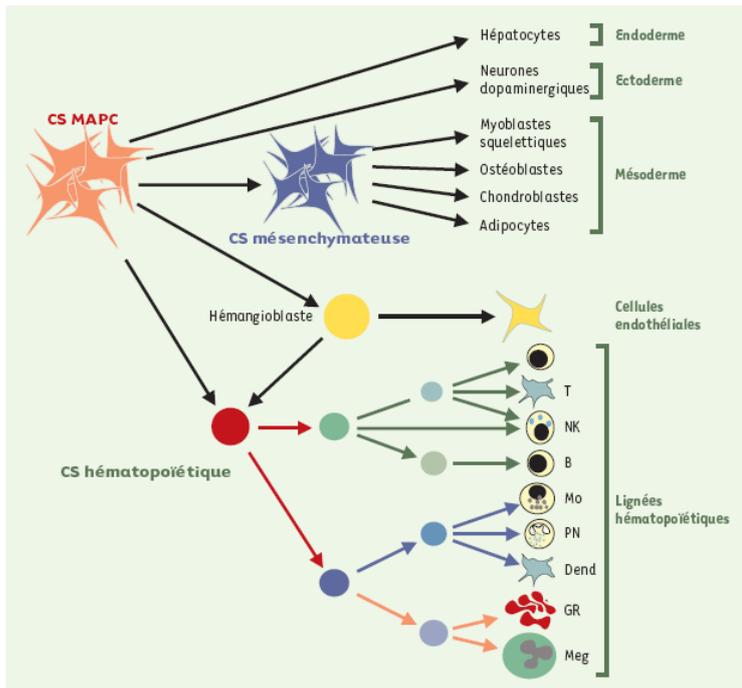


Figure I5 : Filiation proposée pour les différentes populations de cellules présentes dans la moelle osseuse (d'après Coulombel 2003)

Ce schéma, qui fait des MAPC (*multipotent adult progenitor cell*) les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse, est encore spéculatif. En particulier, la filiation des progéniteurs endothéliaux et de l'hémangioblaste est encore mal définie. CS: cellule souche; GR: globule rouge; PN: polynucléaire neutrophile; NK: *natural killer*; Mo: monocyte; Meg: mégacaryocyte; T, B: lymphocytes T et B; Dend: cellules dendritiques.

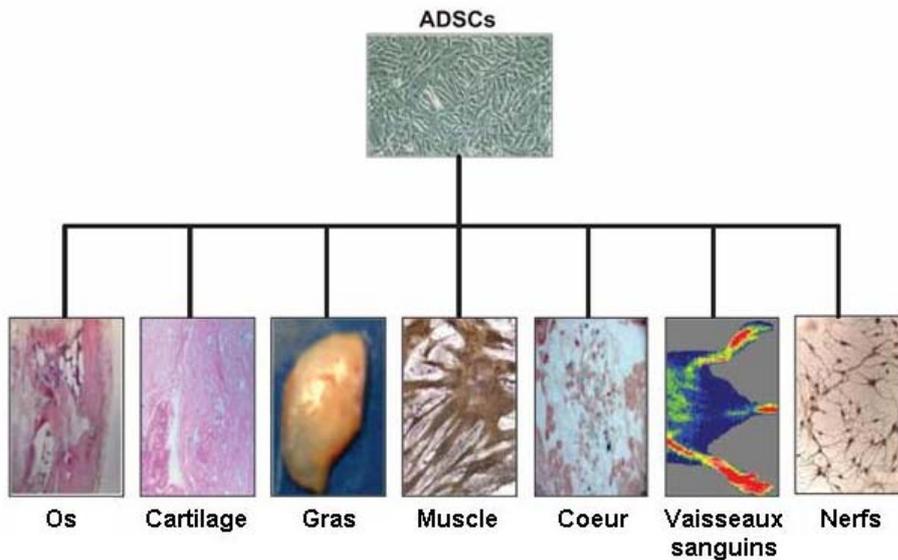


Figure I6 : les dérivés des ADSC (d'après Strem et al. 2005)

Les cellules dérivées du tissu adipeux sont multipotentes, au-delà des lignages mésenchymateux traditionnels

Par ailleurs, des études sur les cellules fœtales retrouvées chez la mère ont ouvert des perspectives de thérapie cellulaire. En effet, il a été montré que quelques cellules fœtales franchissent la barrière du cordon pour se retrouver dans la circulation sanguine de la mère (Herzenberg, Bianchi et al. 1979; Bianchi, Zickwolf et al. 1996). Les cellules fœtales peuvent persister jusqu'à plusieurs années après la grossesse, et coloniser les niches hématopoïétiques de la mère. On parle alors de microchimérisme (Tan, Liao et al. 2005). En cas de lésion de certains organes (foie, thyroïde, cerveau), elles sont alors capables de proliférer, de migrer à l'organe lésé et de se différencier en cellule de l'organe (hépatocyte, neurone) (Bianchi, Zickwolf et al. 1996). Cette notion de microchimérisme est à exploiter pour la question immunologique de la tolérance des cellules fœtales par la mère (Lissauer, Piper et al. 2007).

Les MAPCs (Multipotent Adult Pluripotent Cells)

En 2002, les travaux du laboratoire de Catherine Verfaillie ont permis d'isoler des progéniteurs pluripotents appelés MAPC. Ces cellules présentent un potentiel plus vaste que les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses (**figure I5**). Chez l'homme, il a été démontré qu'une seule cellule pouvait donner les dérivés du mésoderme constituant les membres (ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules stromales, et myoblastes squelettiques) ainsi que le mésoderme « viscéral » (cellules endothéliales) (Reyes, Lund et al. 2001).

Les ADSCs Adipose Tissue- Derived Stem Cells

Le tissu adipeux est un organe dérivé du mésoderme et, au même titre que la moelle, il contient une population stromale composée de cellules endothéliales microvasculaires, des cellules des muscles lisses et des cellules souches (Zuk, Zhu et al. 2001). Ces cellules souches sont facilement extraites par traitement enzymatique et la population homogène qui en résulte correspond aux ADSCs. Ces cellules présentent un potentiel réplicatif intense et une capacité à se différencier dans de nombreux lignages (Zuk, Zhu et al. 2002) (**figure I6**).

Enfin, concernant les cellules souches cardiaques, des travaux récents ont apporté des résultats contredisant le dogme qui avait établi l'inexistence de ces cellules. En effet différentes études relatent l'isolation et la caractérisation de progéniteurs cardiaques à partir de cœurs adultes. Ces travaux seront détaillés dans la deuxième partie de l'introduction.

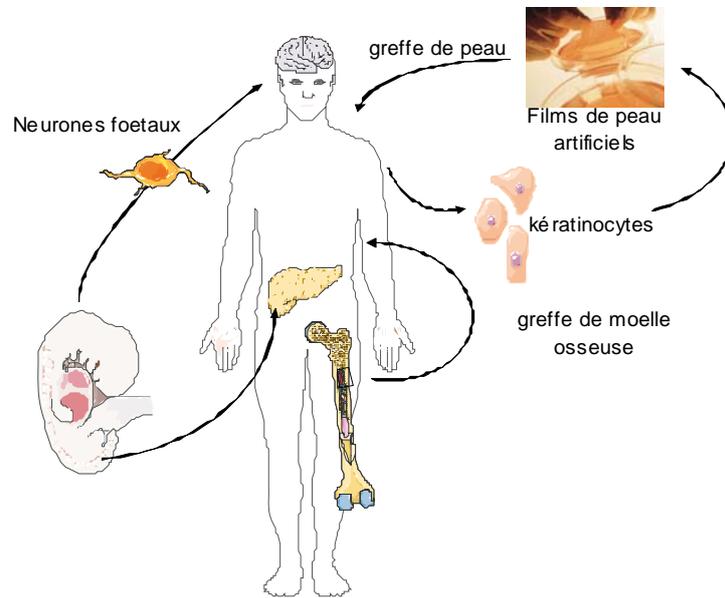


Figure I7 : Les différentes cellules souches adultes utilisées en thérapeutique

1.1.2 Les applications

L'application majeure des cellules souches adultes est représentée par la thérapie cellulaire, définie par les textes comme l'« *administration à un patient de produits biologiques à effets thérapeutiques issus de préparations de cellules vivantes humaines ou animales dans un but préventif ou curatif* » (Clayes 2006). La thérapie cellulaire régénérative peut alors être envisagée pour des maladies dégénératives ou qui entraînent une lésion d'un tissu ou d'un organe.

La thérapie cellulaire à partir de cellules souches adultes est depuis longtemps pratiquée, dans la greffe de moelle et la greffe de peau. Récemment, une étude clinique a été menée sur l'utilisation de cellules fœtales dans la thérapie de la maladie de Huntington (Bachoud-Levi, Remy et al. 2000; Bachoud-Levi, Gaura et al. 2006) et leur effet sur le long terme. Les résultats montrent qu'une telle opération permet une amélioration fonctionnelle sur 7 ans. Les différentes stratégies de thérapie qui ont été développées à partir de cellules souches fœtales et adultes sont schématisées dans la **figure I7**.

Par ailleurs, les maladies cardiovasculaires, qui représentent la première cause de mortalité dans les pays industrialisés, avec environ 180000 décès par an en France, motivent les nombreuses recherches de sources de cellules de remplacement des cardiomyocytes perdus. Les études concernant les progéniteurs cardiaques dans les tissus adultes, et les travaux pour les amplifier et les faire différencier seront développés dans la 2^{ème} partie de cette introduction, ainsi que des essais cliniques réalisés avec différents types de cellules souches adultes.

1.1.3 Les limites

Notion de plasticité

La plasticité cellulaire se définit par un phénomène qui amène une cellule engagée, spécialisée dans une voie de différenciation, à changer de voie et donner, sous certaines conditions micro-environnementales, des dérivés d'un tissu très différent du tissu d'origine. Les travaux à l'origine de cette notion sont ceux de Bjornson et collaborateurs : des cellules souches neurales murines, injectées par voie intraveineuse dans une souris irradiée, ont induit la production de cellules sanguines (Bjornson, Rietze et al. 1999). Certains auteurs ont établi

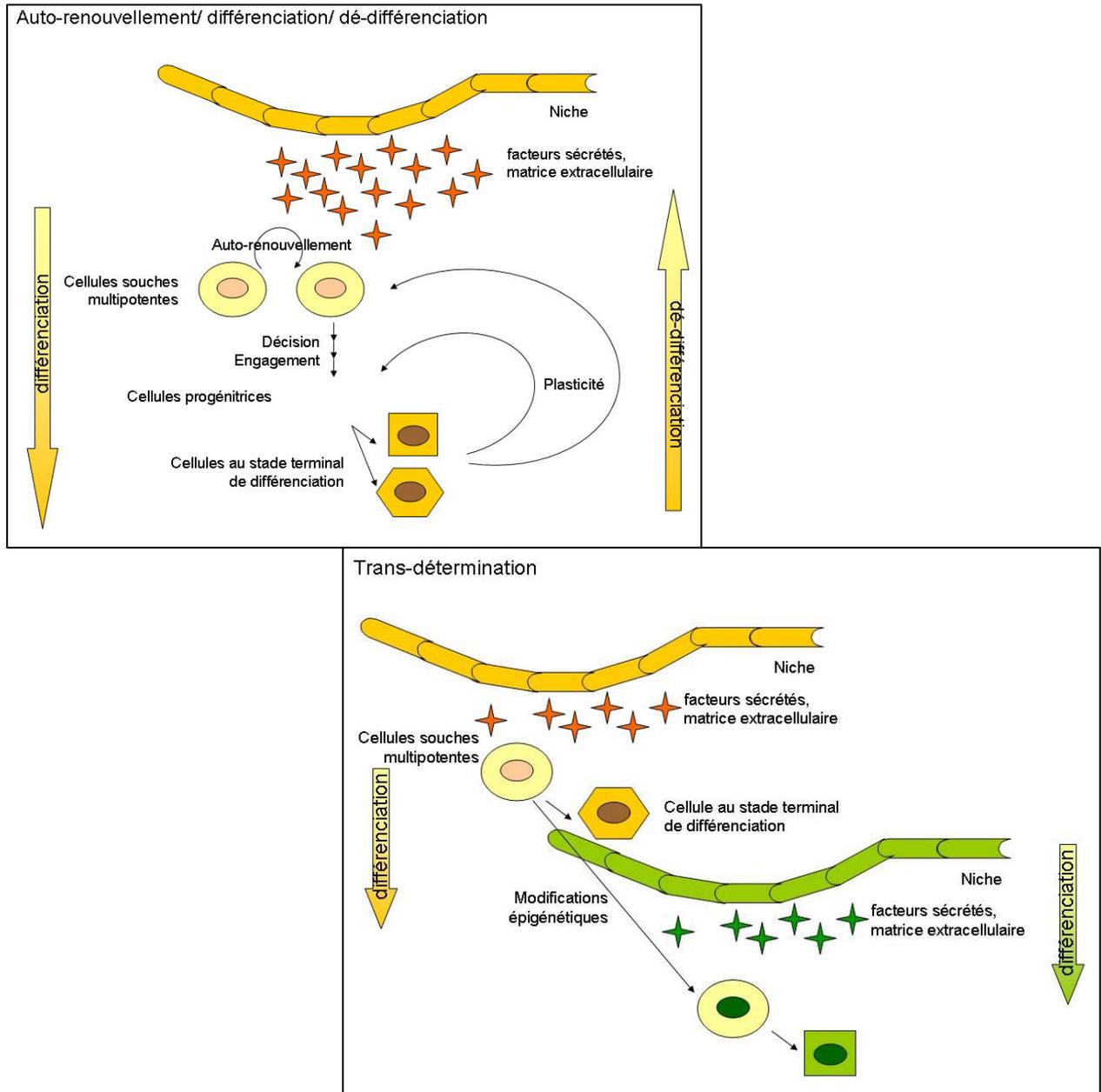


Figure I8 : Plasticité cellulaire des cellules souches adultes (d'après Perino et al. 2008)

Les cellules souches qui s'auto-renouvellent de manière intrinsèque, peuvent se différencier en un ou plusieurs types de progénie, selon leur potentiel. Le processus de différenciation ne serait cependant pas unidirectionnel et des événements de dé-différenciation peuvent se produire. La trans-détermination implique un changement de lignage qui peut se produire lorsque les cellules souches sont placées dans une « nouvelle niche ». Un changement dans les signaux localement perçus en premier lieu, et éventuellement des modifications épigénétiques expliqueraient ce changement de lignage.

des critères précis pour appliquer à bon escient le terme de plasticité à des cellules transplantées : il faut pouvoir prouver 1) qu'une cellule peut se différencier en multiples lignages, 2) que les cellules obtenues sont fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* et 3) que les greffes sont robustes et persistantes (Lakshmipathy and Verfaillie 2005). Par la suite, les résultats rapportés précédemment ont été attribués à des événements de fusion cellulaire ou de dé-différenciation, phénomène qui consiste pour la cellule à retrouver des propriétés de multipotence/pluripotence et à se différencier en un autre type cellulaire que celui de départ. Cette notion a été illustrée par les modifications épigénétiques induites par un traitement à la 5-azacytidine *in vitro* (Lassar, Paterson et al. 1986) qui permettent d'obtenir des myoblastes à partir de fibroblastes.

Enfin, la niche a une influence sur le devenir des cellules souches qui y résident. Des expériences de marquage ont permis de suivre le devenir de cellules souches ré-implantées dans une niche différente de celle dont elles proviennent, en partie à cause des signaux au sein de la niche (Alison, Poulson et al. 2000; Theise, Nimmakayalu et al. 2000).

Ces phénomènes, résumés dans la **Figure 18**, peuvent avoir lieu *in vitro* et impliquent que les cellules isolées doivent être cultivées pendant un laps de temps assez court si l'on veut qu'elles conservent leurs propriétés d'origine.

Problèmes pour isoler, identifier et caractériser les cellules souches adultes

S'il ne fait pas de doute de l'existence de cellules souches adultes dans de nombreux organes, leur nombre reste encore à être défini, même si tout le monde s'accorde à l'estimer très faible. Cette rareté au sein d'un organe rend leur isolation fastidieuse. De plus, l'absence de marqueur spécifique des cellules souches complique encore leur identification. De fait, cette caractérisation passe par celle de la descendance obtenue *in vitro* et *in vivo*, c'est-à-dire une caractérisation indirecte et rétrospective (Coulombel 2003). Il est alors essentiel de se placer au niveau de la cellule unique, en raison de l'hétérogénéité des tissus de départ, et dans des conditions qui permettent l'expression de toutes ses capacités de prolifération et de différenciation. Ce dernier critère est difficile à remplir compte tenu des différences de spécificité et de l'incompatibilité des environnements nécessaires pour chaque voie de différenciation. De même, la clonalité nécessite une purification à homogénéité *quasi* impossible à obtenir.

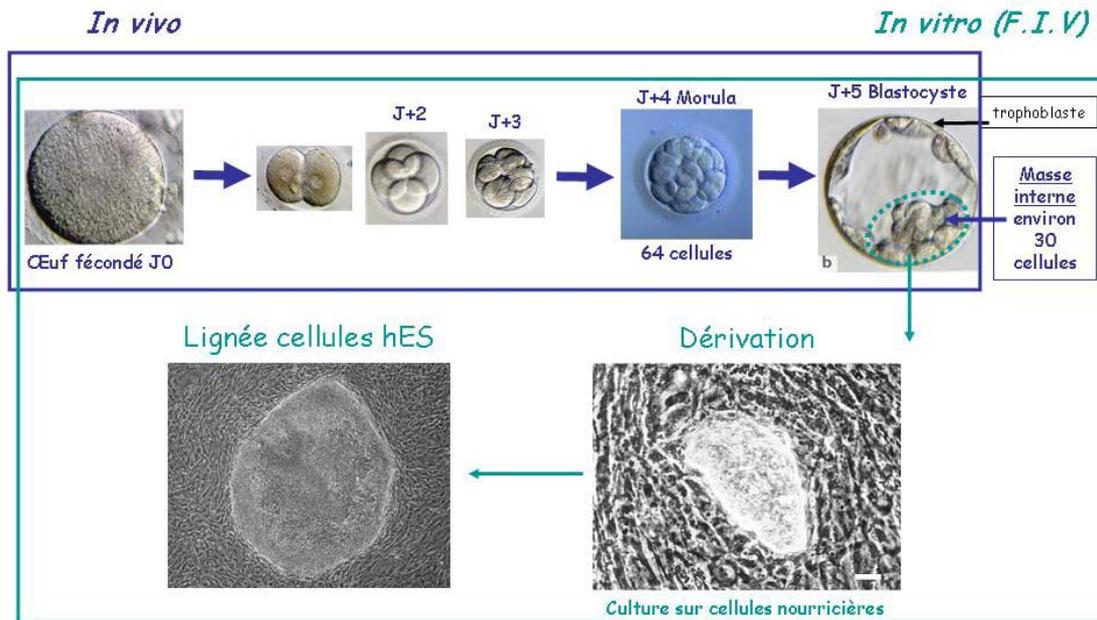


Figure I9 : Les premiers jours du développement embryonnaire et la dérivation des cellules souches embryonnaires.

A partir d'un œuf fécondé, noté stade J0, les cellules entrent en division. Au stade blastocyste, les cellules sont organisées spatialement en deux structures, le trophoblaste et la masse interne. La première va donner les tissus extra-embryonnaires, tandis que les cellules de la masse interne vont donner les trois feuillets embryonnaires et leurs dérivés qui constitueront l'individu.

Le faible nombre des cellules souches adultes, les difficultés pour les isoler, les caractériser, ainsi que pour les amplifier font que d'autres ressources biologiques sont envisagées pour la thérapie cellulaire.

1.2 Définition et propriétés des cellules souches embryonnaires humaines (hES)

1.2.1 Historique

Les hES ont été dérivées pour la première fois en 1998 par Thomson et collaborateurs après le succès des dérivations de cellules souches embryonnaires chez la souris en 1981 (Martin 1981; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998) et chez le primate en 1995 (Thomson, Kalishman et al. 1995). Elles sont obtenues à partir de la masse interne des blastocystes. En 2006, une revue dénombrait 414 lignées humaines pour lesquelles des informations étaient disponibles (Guhr, Kurtz et al. 2006), mais seulement 49,2% de ces lignées ont été caractérisées dans des journaux scientifiques et pas plus de 15 lignées ont été utilisées dans au moins 10 études recensées. Ces chiffres sont obtenus à partir du nombre de lignées utilisées au 1^{er} janvier 2006 et dont les données sont disponibles à travers des sources publiques (Guhr, Kurtz et al. 2006). Plus récemment, l'Initiative Internationale des cellules souches, (International Stem Cells Initiative, ISCI) a évalué le phénotype des cellules souches en analysant sur 59 lignées indépendamment dérivées dans 7 laboratoires, dans 11 pays pour l'expression de 17 marqueurs membranaires et 93 gènes, choisis comme marqueurs de l'état indifférencié ou des dérivés différenciés (Adewumi, Aflatoonian et al. 2007). Les résultats montrent que toutes les lignées indépendantes présentent un profil d'expression commun pour un ensemble de marqueurs membranaires et de gènes, en dépit de leur différents fonds génétiques et du fait qu'elles aient été dérivées dans différents laboratoires à travers le monde, par différentes techniques. Même si des divergences ont été détectées soit au niveau du phénotype, soit dans la propension à se différencier, l'étude démontre qu'il n'y a pas de différences marquées entre les lignées de cellules hES (Adewumi, Aflatoonian et al. 2007).

Le protocole de dérivation décrit par Thomson et Reubinoff consiste à obtenir des cellules à partir des embryons obtenus par fécondation *in vitro* (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Reubinoff, Pera et al. 2000) (**figure I9**). Les embryons obtenus âgés de 2 jours sont mis en culture jusqu'au stade blastocyste (6 jours). La zone pellucide est soumise à la digestion par la

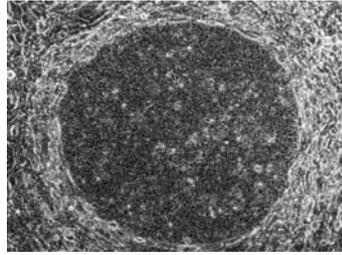


Figure 10 : *Colonie de cellules hES en culture sur des cellules nourricières de fibroblastes murins embryonnaires (MEF)*

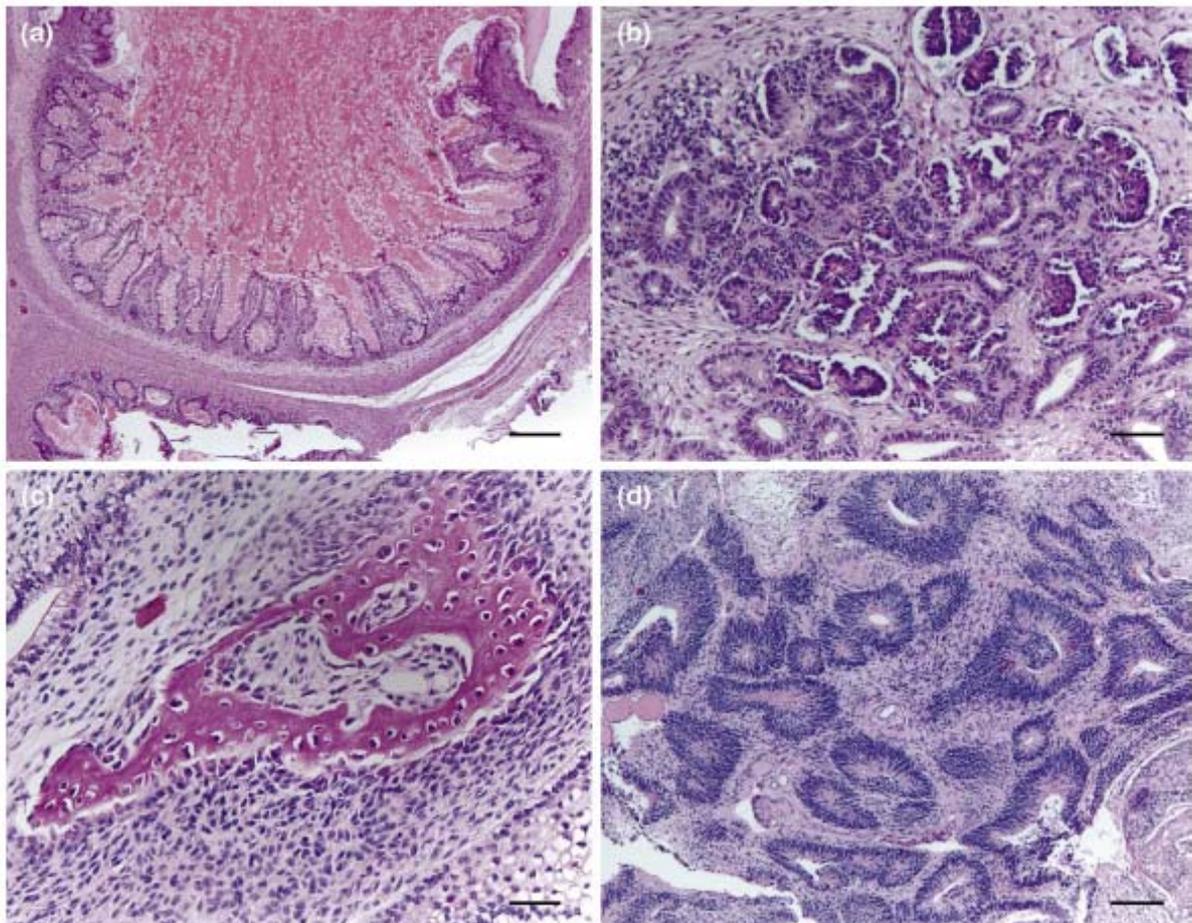


Figure I11 : *Tératomes formés par des lignées de cellules hES* (d'après Thomson *et al.* 2000)

Des cellules hES injectées dans des souris immunocompétentes forment des tératomes bénins avec une abondante différenciation de dérivés des trois feuilletts embryonnaires (a) intestin (barre=250 μ m), (b) tubules rénaux et glomérules foetaux (barre= 67 μ m), (c) os (barre = 50 μ m) et (d) ectoderme neural (barre=167 μ m)

Pronase. Puis, pour isoler les cellules de la masse interne, le trophoctoderme est retiré par immunochirurgie. Cela consiste à soumettre le blastocyste au complément constitué par du sérum de cochon d'Inde, puis à un sérum anti-humain. Les cellules sont ensuite cultivées sur des cellules nourricières. Le caryotype des cellules de lignées obtenues est analysé après les 2^{ème} et 7^{ème} passages.

Certains protocoles ont été développés pour exploiter des embryons exclus de toute ré-implantation à cause de leur faible qualité. En raison de cette pauvre qualité, le protocole doit être ajusté en ajoutant du Leukemia Inhibitory Factor humain (hLIF) et du basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) dans le milieu de culture des cellules de la masse interne qui ont été récupérées après digestion de la zone pellucide et traitement au complément et au sérum (Mitalipova, Calhoun et al. 2003).

Les lignées de cellules embryonnaires humaines (hES) obtenues après dérivation prolifèrent indéfiniment à l'état indifférencié en culture. Les premières lignées obtenues ont pu supporter 44 à 54 passages, soit 4 à 5 mois en culture *in vitro* (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Reubinoff, Pera et al. 2000), les lignées récemment dérivées vont au-delà de 100 passages (Mateizel, De Temmerman et al. 2006). La stabilité à long terme est une caractéristique importante qu'il faut contrôler, car des cellules peuvent présenter les marqueurs d'indifférenciation et pourtant être devenues aneuploïdes. En effet, il a été montré que le caryotype pouvait être stable après un temps prolongé en culture *in vitro*, (Buzzard, Gough et al. 2004), mais il a aussi été détecté une certaine instabilité récurrente des chromosomes 12 et 17 dans certaines conditions qui stressent les cellules hES telles que l'utilisation d'enzyme pour dissocier les cellules lors de passages (Brimble, Zeng et al. 2004; Draper, Smith et al. 2004).

Les cellules hES présentent une activité télomérase supérieure à celle constatée dans les cellules somatiques. Cela suggère qu'elles garderont un potentiel réplicatif bien plus longtemps que des cellules somatiques. Les spécificités des cellules hES sont 1) une morphologie caractéristique de cellules rondes se développant en colonies (**figure I10**) et 2) l'expression de marqueurs membranaires et cytoplasmiques. En effet, la signature de telles cellules n'est pas associée à un marqueur unique mais à l'expression combinée des marqueurs de surface tels que SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigens), TRA 1-60, TRA 1-81 (Tumor Rejection Antigen), ainsi que de facteurs de transcription comme OCT4 ou Nanog.

Pour caractériser la capacité à former les trois feuillets, les cellules sont testées pour leur propension à former des tératomes lorsqu'elles sont injectées dans des souris

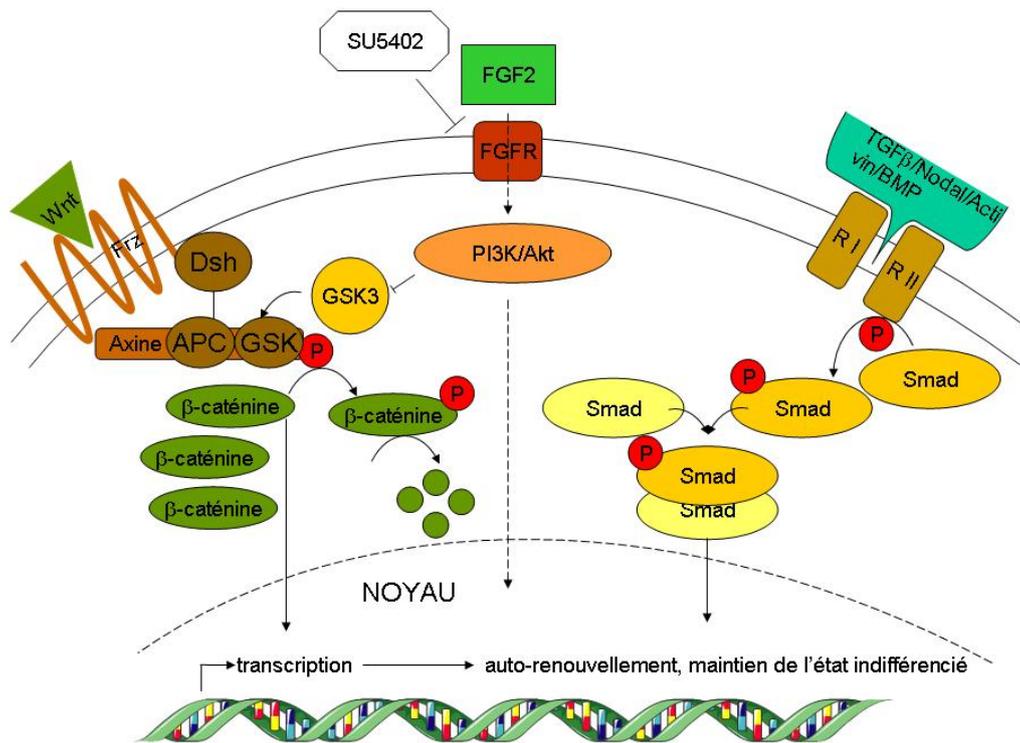


Figure I12: Schéma représentant les différentes voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'état indifférencié.

Les gènes du maintien de l'état indifférencié sont activés par des cascades de signalisation impliquant les récepteurs de Wnt (Frizzled), du FGF2 (FGFR qui peut être inhibé par le SU5402), et/ou les récepteurs au TGF-β, à l'Activine ou BMP qui fonctionnent en dimères.

immunodéficientes. Les tissus caractérisés dans ces tératomes sont de l'épithélium intestinal (dérivé de l'endoderme), du cartilage, de l'os, du muscle lisse, strié (dérivés du mésoderme), de l'épithélium neural, des ganglions embryonnaires et de l'épithélium squameux stratifié (dérivés de l'ectoderme) (**figure I11**).

1.2.2 L'état indifférencié

L'une des voies majeures des études sur les cellules souches embryonnaires concerne la compréhension du maintien de la pluripotence de ces cellules. Les différents essais pour améliorer les protocoles de culture de hES ont mis en évidence que des facteurs extérieurs, contenus dans le milieu de culture, et/ou produits par les cellules nourricières et/ou encore présents dans la matrice extracellulaire, influent sur le maintien de la pluripotence.

Les acteurs du maintien de l'état indifférencié

Les données du transcriptome montrent que parmi les gènes exprimés préférentiellement dans les cellules souches embryonnaires par rapport à des cellules différenciées, seulement 17% des protéines codées par ces gènes sont impliquées dans la régulation et la transduction du signal. Peu de facteurs sont à l'origine de la régulation de nombreux gènes, et il apparaît que les réponses cellulaires sont fonction des interactions ligand-récepteur en termes de dose, de durée de stimulation et en fonction des combinaisons de facteurs stimulant les voies de signalisation. Les différents facteurs externes vont soit 1) activer la voie Akt/PI3 kinase, qui permet la survie cellulaire à travers OCT4, Sox-2 et Nanog, soit 2) éviter la différenciation cellulaire et maintenir l'état indifférencié au cours de la prolifération ou 3) comme Wnt, stimuler c-Myc, la cyclin D et ainsi stimuler la prolifération (**figure I12**). En effet, la glycoprotéine Wnt se fixe à son récepteur Frizzled et inhibe la voie de la Glycogène-Synthase Kinase-3 (GSK-3). S'ensuit une accumulation nucléaire de β -caténine et l'expression des gènes cibles. Parmi ces derniers, on identifie OCT4, Rex1 (ou Zinc-finger protein 42, ZEP42), Nanog, la Cycline D1, MYC et des protéines BMP (pour revue, Liu, Lu et al. 2007).

OCT4 est le produit du gène *Pou5f1*, un facteur de transcription à homéodomaine possédant un domaine POU (PIT/OCT/UNC). Son expression, forte dans les cellules ES est diminuée au cours de la différenciation. Il a longtemps été considéré comme LE marqueur de l'état indifférencié, cependant il a été montré qu'au cours de la différenciation neurale, OCT4 est fortement ré-exprimé (Shimozaki, Nakashima et al. 2003). D'après une récente revue, il

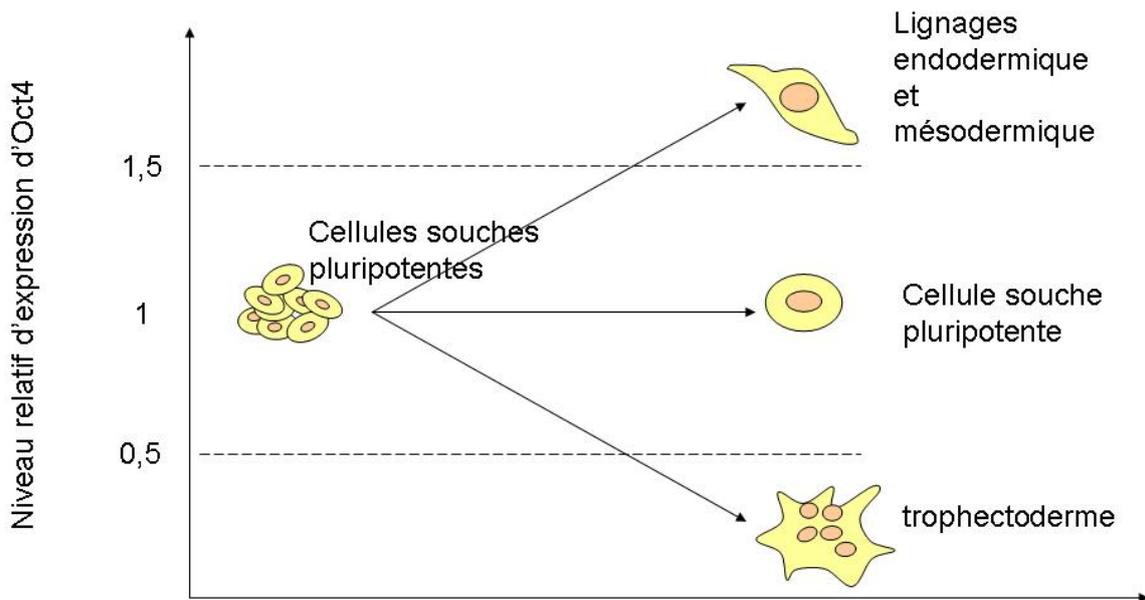


Figure I13 : Relation entre niveau d'expression d'Oct4 et destin des cellules souches (d'après Niwa et al, 2001)

Pour maintenir le phénotype indifférencié, l'expression d'Oct4 doit rester à plus ou moins 50% de l'expression normale diploïde. Si l'expression d'Oct4 augmente et dépasse le seuil supérieur, la différenciation vers les lignage mésodermique et vers l'endoderme primitif est engagée, alors que si le niveau d'expression passe sous le seuil inférieur, les cellules souches donnent du trophoctoderme.

apparaît qu'OCT4 n'est pas limité à ce rôle et participerait à l'engagement dans des voies de différenciation (Stefanovic and Puceat 2007). En 2000, une étude dans les cellules ES de souris montrait déjà qu'à un niveau d'expression d'OCT4 représentant 50% de transcrits d'une cellule, l'état indifférencié des cellules souches est maintenu, tandis que lorsque l'expression dépasse un certain seuil (correspondant à 150% d'expression normale diploïde), les cellules se différencient dans une voie endodermique ou mésodermique (Niwa, Miyazaki et al. 2000) (**figure I13**). Pour expliquer ce constat, une hypothèse serait qu'une augmentation de la quantité de protéines favoriserait une dimérisation des facteurs de transcription, ce qui permettrait ainsi d'activer la transcription de gènes différents de ceux ciblés par la protéine lorsqu'elle est sous forme monomérique ou organisée en hétérocomplexe. A l'inverse, en dessous de 50% d'expression normale d'OCT4, les cellules sont redirigées vers un lignage trophoblastique. Cette notion de quantité régulée finement et dont la variation influe sur le devenir des cellules suggère un mécanisme de gradient de morphogènes essentiels pendant l'embryogenèse, et ici rendu visible au niveau cellulaire.

Par ailleurs, il a été montré qu'une déficience en OCT4 dans les cellules ES induit une différenciation donnant des cellules de type trophoblastique.

Des expériences d'interférence à l'ARN, d'analyses transcriptomiques et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis d'identifier plusieurs cibles d'OCT4 parmi lesquelles on peut compter *Fgf4*, *Utf1*, *Opn*, *Rex1/Zpf42*, *Fbx15*, *Nanog* et *Sox2* (Boiani and Scholer 2005). Peu d'études s'intéressent au rôle d'OCT4 dans la différenciation neurale, la recherche de gènes cibles dans ce contexte n'est, de ce fait, pas étayée. En ce qui concerne la voie mésodermique activée en cas de surexpression d'OCT4, les travaux de Michel Pucéat montrent que ce facteur de différenciation est impliqué dans la différenciation cardiaque (Zeineddine, Papadimou et al. 2006) dans les cellules ES de souris.

Parmi les principaux acteurs du maintien de l'état indifférencié, on compte SOX2, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de transcription et de la structure de la chromatine (Pevny and Lovell-Badge 1997; Avilion, Nicolis et al. 2003). En interagissant avec OCT4 sur le promoteur de certains gènes, SOX2 participe au maintien de la pluripotence dans les cellules ES, ainsi que dans la différenciation de leurs dérivées.

Un autre facteur de transcription clé pour le maintien de la pluripotence est représenté par *Nanog* qui semble agir en parallèle du couple OCT4-SOX2. *Nanog*, du celtique « Tir nan Og » qui signifie « pays de l'éternel jeune », est un facteur de transcription à homéodomaine (Chambers, Colby et al. 2003; Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). *Nanog* seul permettrait, non pas

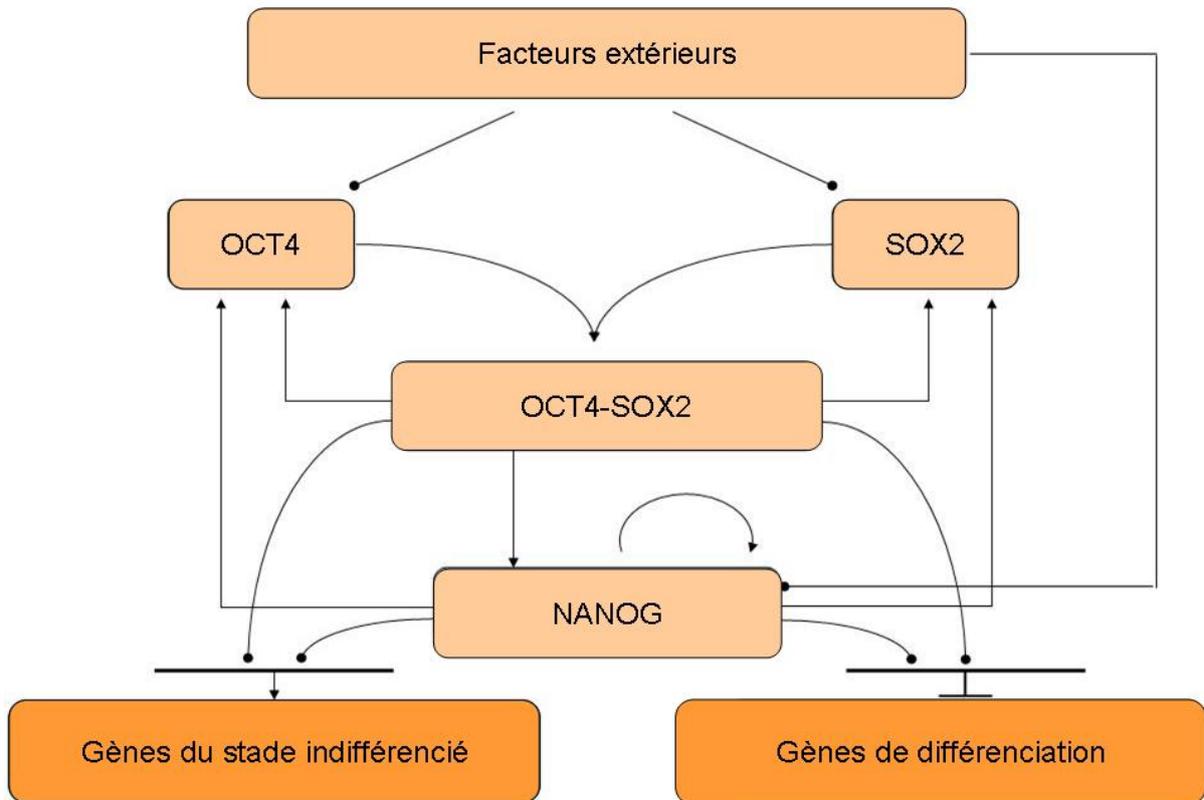


Figure I14 : Schéma du cœur du réseau transcriptionnel des cellules ES (d'après Mitsui *et al.* 2003).

Les flèches partantes représentent une protéine (les flèches se rejoignant représentant la formation du complexe OCT4-SOX2), chaque flèche entrante représente une protéine ayant un rôle de facteur de transcription

de bloquer complètement la différenciation, mais de la retarder. A nouveau, la quantité de protéines Nanog exprimées est cruciale pour maintenir de manière stable l'état indifférencié des cellules souches embryonnaires.

Ces 3 acteurs semblent être au cœur d'un réseau transcriptionnel. Ce réseau pourrait être assimilé à un circuit bistable (possédant deux états stables), résultat de boucles de rétrocontrôle positif. Le schéma représenté **figure I14** met bien en évidence le nombre de boucles rétropositives impliquées dans le processus de maintien de l'état indifférencié. On comprend alors qu'un changement dans leur stœchiométrie, même faible, perturbe le circuit d'autorégulation et peut induire la différenciation des cellules (Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Les cibles de ces protéines sont : des éléments de changement de structure de la chromatine et de complexes modifiant les histones, des facteurs de transcription, des miRNA impliqués dans le maintien de l'état indifférencié et qui sont régulés positivement par OCT4, SOX2 et Nanog, ou des gènes impliqués dans la différenciation et qui sont alors réprimés par les 3 facteurs de transcription.

Epigénétique

Il existe une autre signature du phénotype indifférencié au niveau épigénétique. Les étapes primordiales de modifications épigénétiques au cours de la vie ont lieu 1) pendant la gamétogenèse et 2) juste après la fécondation, jusqu'au moment de l'implantation de l'embryon. C'est dire si les cellules souches embryonnaires sont concernées par ce processus et sont de ce fait différentes des cellules germinales et somatiques adultes.

L'épigénétique concerne les processus d'hérédité réversibles qui ne sont pas fondés sur des changements dans la séquence d'ADN. Les modifications épigénétiques comprennent les phénomènes de méthylation de la molécule d'ADN, les modifications covalentes sur les histones, les gènes soumis à empreinte et le « RNA silencing ». Ces changements concernent la structure de la chromatine en la rendant plus ouverte ou plus condensée et donc en rendant l'ADN accessible ou non aux facteurs impliqués dans la transcription (pour revues, Jacob and Moley 2005; Lunyak and Rosenfeld 2008).

Il a été montré que les cellules ES, les cellules précurseurs et différenciées ne présentent pas les mêmes caractéristiques de condensation de la chromatine. Notamment, la chromatine de

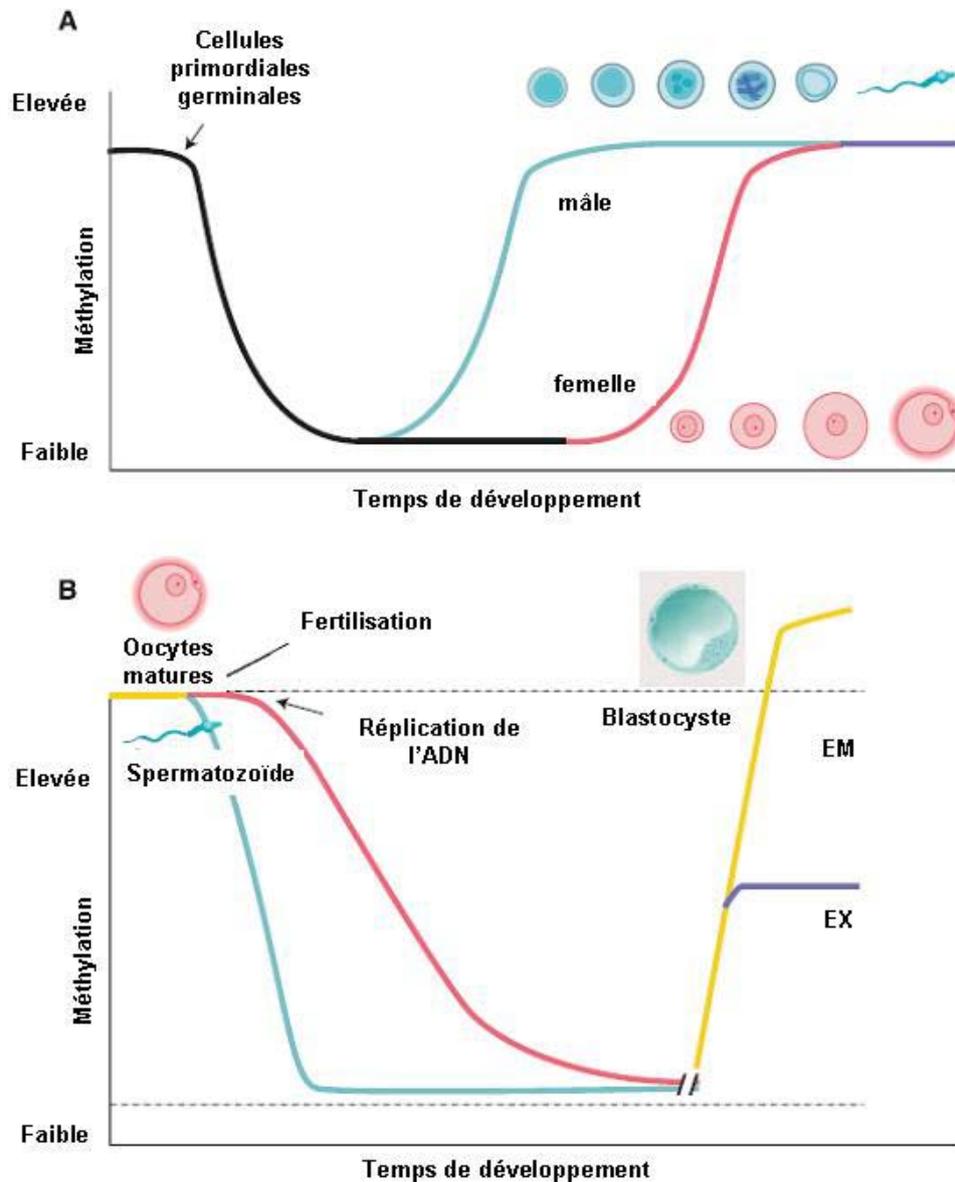


Figure I15 : Reprogrammation de la méthylation dans la lignée germinale (d'après Reik et al. 2001).

(A) Les cellules primordiales germinales (Primordial germ cells, PGCs) chez la souris deviennent déméthylées tôt dans le développement. La reméthylation commence au stade prospermatogonie dans la lignée germinale du mâle à E16, et après la naissance dans les oocytes en croissance. Quelques étapes du développement des cellules germinales sont représentées. (B) **Reprogrammation de la méthylation dans les embryons avant l'implantation.** Le génome paternel (en bleu) est déméthylé par un mécanisme actif immédiatement après fertilisation. Le génome maternel (en rouge) est déméthylé par un mécanisme passif qui dépend de la réplication de l'ADN. Les deux génomes sont reméthylés au moment de l'implantation à différents taux dans les lignées embryonnaires (EM) et extra-embryonnaires (EX). Les gènes à empreinte méthylés et certaines séquences répétées (ligne inférieure en pointillés) ne deviennent pas déméthylés. Les gènes à empreinte non méthylés (ligne supérieure en pointillés) ne deviennent pas méthylés.

cellules ES est d'une plasticité supérieure à celle des cellules différenciées. Les mécanismes responsables de cette propriété particulière de la chromatine des cellules ES restent inconnus. Au cours de la gamétogenèse, les marques de méthylation de l'ADN sont effacées et une méthylation *de novo* se produit par la suite (**figure I15**). Les produits de la gamétogenèse sont donc différents suivant le stade du cycle où l'on se place. Les génomes des gamètes mâles et femelles présentent aussi des différences de structure entre eux. Dans les spermatozoïdes, l'ADN est plus méthylé, plus compacté, autour de protamines alors que l'ADN des oocytes est enroulé autour d'histones. Au moment de la fertilisation, l'ADN paternel subit une déméthylation qui s'accompagne d'un échange des protamines paternelles pour des histones maternelles. Le génome maternel se déméthyle également mais plus lentement. Enfin, au moment de l'implantation se produit une méthylation *de novo*. A ce stade, les changements épigénétiques sont cruciaux pour le bon déroulement du développement, parce qu'ils concernent la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le déterminisme cellulaire, spécifiques du stade embryonnaire et des gènes de clivage cellulaire.

Ces gènes sont donc soumis à une inactivation flexible puisqu'ils sont inactifs chez l'adulte, actifs chez l'embryon avec obligation de retourner à l'état inactif au cours du développement. Contrairement à la plupart des gènes qui sont actifs quelle que soit leur origine, les gènes soumis à empreinte sont des gènes dont l'activité dépend de leur origine maternelle ou paternelle. Les gènes soumis à empreinte parentale sont exprimés de façon mono-allélique, à partir du génome maternel ou paternel. Il en résulte une différence fonctionnelle des deux génomes, qui sont tous deux nécessaires au développement normal de l'embryon.

Des dérèglements de méthylation de certains gènes à empreinte sont associés à des maladies telles que le syndrome de Prader-Willi, le syndrome de Beckwith-Wiedmann, l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright, le diabète néonatal transitoire ou le syndrome d'Angelman.

En ce qui concerne le processus de l'inactivation du X, il apparaît d'après les études menées chez la souris, que dès le stade 4/8 cellules, le X paternel est progressivement inactivé. Cette inactivation perdure jusqu'au stade blastocyste précoce. Le chromosome X paternel reste inactivé dans les cellules extra-embryonnaires, c'est-à-dire dans le placenta essentiellement. Dans le bouton embryonnaire, au moment de l'implantation de l'embryon dans l'utérus, le X paternel est réactivé. Durant un court moment, les cellules du futur fœtus auront à nouveau deux chromosomes X actifs. Puis l'un des deux est inactivé, de façon aléatoire cette fois. Dans les cellules de la lignée somatique, cette inactivation est maintenue. Par contre, dans les

cellules de la lignée germinale, qui produiront les ovocytes, le chromosome X est à nouveau réactivé.

Au niveau des cellules hES, qui correspondent à un stade intermédiaire entre la fécondation et l'implantation, la signature épigénétique concerne plus particulièrement l'état de méthylation de l'ADN et des histones au niveau des gènes soumis à empreinte et le processus d'inactivation du X qui se met en place. Ce concept des modifications épigénétiques doit donc être pris en compte lorsque l'on envisage une thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de cellules hES. En effet, il apparaît que les blastocystes ne sont pas homogènes au niveau épigénétique, ce qui implique que les cellules hES n'ont pas toutes le même potentiel de différenciation. Par ailleurs des facteurs extérieurs sont responsables d'altérations épigénétiques. Ainsi, de vrais jumeaux se ressemblent de moins en moins au cours de leur vie. Mais cela peut avoir un effet néfaste sur la dérivation des cellules hES car il a notamment été montré que les conditions de culture des embryons issus de fertilisation *in vitro* peuvent provoquer des modifications épigénétiques (Jacob and Moley 2005).

1.2.3 La différenciation

Lorsque le stade indifférencié n'est plus maintenu, les cellules souches embryonnaires enclenchent un processus de différenciation qui peut aboutir à la formation de tous les types cellulaires constituant un organisme. Cette différenciation peut être spontanée ou dirigée.

La différenciation spontanée

Celle-ci a été observée en périphérie et au centre des colonies (Reubinoff, Pera et al. 2000), mais le phénomène le plus flagrant reste la formation de colonies sphéroïdes appelées corps embryoïdes. Ce phénomène a lieu lorsque l'on retire les cellules ES des cellules nourricières et du milieu de culture contenant les agents qui sont responsables de l'auto-renouvellement pour les placer en suspension. Les corps embryoïdes sont des structures tridimensionnelles qui présentent certains aspects des stades précoces de l'embryogenèse avec l'apparence de certaines régions de différenciation similaires à celles présentes dans l'embryon et qui sont les trois feuillets embryonnaires. Former des corps embryoïdes à partir de cellules hES est un processus peu évident et peu reproductible en termes de nombre et taille des corps embryoïdes. Certains scientifiques ont donc cherché à optimiser et systématiser la technique. Une technique a montré des résultats intéressants en dissociant les cellules par un traitement enzymatique avant la culture en suspension (Itskovitz-Eldor, Schuldiner et al. 2000). En

**Différenciation spontanée
des cellules souches embryonnaires**

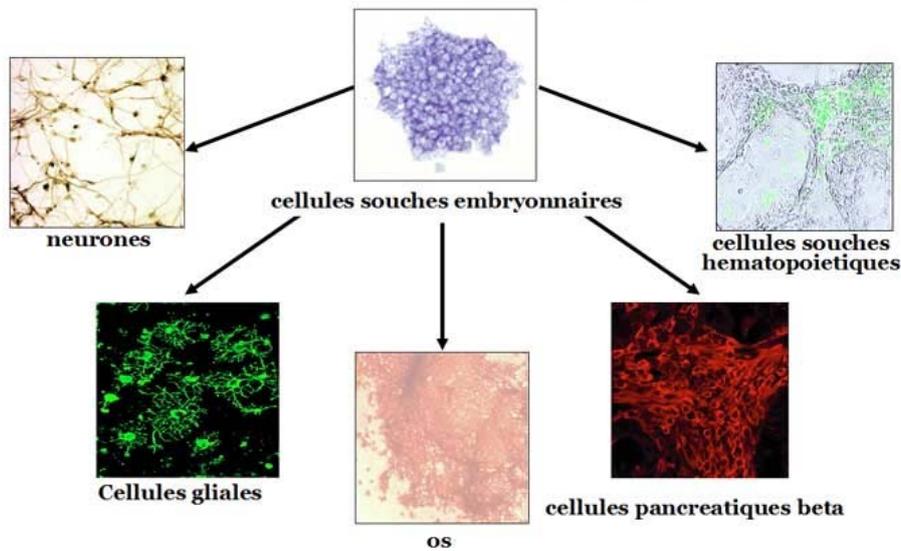


Figure I16 : *Les différents types cellulaires obtenus après différenciation spontanée*

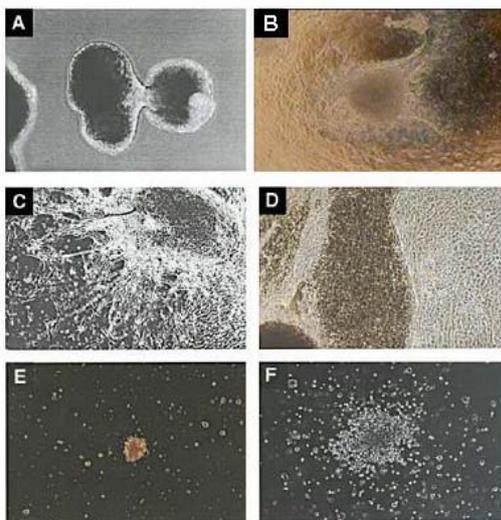


Figure I17: *Différenciation in vitro de cellules hES sous différentes conditions* (d'après Odàrico et al. 2001)

Les cellules hES en suspension se différencient en corps embryoides ou agrégats multicellulaires mimant un embryon de quelques jours. A) un corps embryoides isolé cultivé 8 jours en suspension présente la complexité de la structure de ces corps embryoides (contraste de phase 100x). Après 8-14 jours de culture en suspension, les corps embryoides sont transférés sur du plastique de culture gélatiné pour poursuivre la différenciation et la croissance de plusieurs types cellulaires dont :

B) des cardiomyocytes battant spontanément (contraste de phase, 10X)

C) des cellules neurales (contraste de phase, 40x)

D) des cellules épithéliales pigmentées et non pigmentées (contraste de phase, 100x).

E) après une différenciation initiale sur des cellules stromales de moelle osseuse suivie d'un ensemencement sur un support semi-solide dans un milieu contenant des facteurs de croissance hématopoïétiques, les cellules se différencient en BFU-E (darkfield contraste de phase, 50x) et en

F) colony-forming unit-granulocyte colonies et colonies de macrophage (CFU-GM) (darkfield contraste de phase, 100x)

recherchant des marqueurs précoces spécifiques des différents feuillets embryonnaires, il a été ainsi montré que les corps embryoïdes contiennent des régions de différenciation cellulaire endodermique, ectodermique et mésodermique. Sans traitement par des facteurs de croissance, les cellules issues des corps embryoïdes s'engagent vers la différenciation hématopoïétique et dans le lignage ectodermique, pour donner préférentiellement des cellules neurales (neurones, cellules gliales), des cellules de la peau, du pancréas type beta et des cardiomyocytes (**figure I16**). Par des techniques de tri en utilisant des caractéristiques morphologiques ou des marqueurs de surface spécifiques, on peut isoler certaines populations cellulaires. Pour obtenir les autres types cellulaires, il faut guider plus précisément la différenciation.

La différenciation dirigée

Pour favoriser l'engagement dans une voie de différenciation *in vitro*, l'approche a été d'utiliser les différents facteurs de croissance activant les facteurs de transcription endogènes en combinaison avec d'autres facteurs ou leurs antagonistes. La durée de traitement, les concentrations, les combinaisons de ces facteurs sont des paramètres à déterminer pour établir un protocole efficace. Il faut aussi déterminer la durée de culture des corps embryoïdes en suspension, le support de culture après cette culture en suspension ou encore envisager de co-cultiver les cellules hES avec des cellules favorisant la différenciation dans une voie, le tout en se basant sur les connaissances acquises sur le développement embryonnaire. Les techniques de modification génétique de cellules hES s'étant développées, il est également possible d'induire l'activation de facteurs de transcription ou de sélectionner une population de cellules exprimant un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur de gène spécifique d'un lignage. Les essais sur la souris sont nombreux et les protocoles de différenciation presque rodés, ce qui pouvait laisser penser que l'application aux cellules humaines ne serait que simple transposition. Cependant, il existe des différences notables entre les cellules souches embryonnaires murines et humaines (Ginis, Luo et al. 2004). Par la différenciation dirigée, il est aujourd'hui possible d'obtenir, à partir des cellules hES, des cellules neurales de différents types (Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Park, Lee et al. 2004; Perrier, Tabar et al. 2004; Li, Du et al. 2005), des cellules de type îlots de Langerhans (Rambhatla, Chiu et al. 2003; Segev, Fishman et al. 2004; Stamp, Crosby et al. 2005), des cellules hépatiques (Rambhatla, Chiu et al. 2003; Stamp, Crosby et al. 2005), des cellules de l'os, des adipocytes (Barberi, Bradbury et al. 2007) et des cardiomyocytes (Kehat, Kenyagin-Karsenti et al. 2001; Mummery, Ward et al. 2002; He, Ma et al. 2003). Mais il reste encore des améliorations à

apporter, soit en matière de rendement en cellules d'intérêt, notamment en ce qui concerne les cardiomyocytes, soit pour encore obtenir certains types cellulaires, comme les cellules de muscles squelettiques.

Les différents essais de différenciation à partir des cellules hES sont reportés dans les **tableaux IT1 et IT2**, en fonction des lignages issus des différents tissus embryonnaires et certaines cellules issues de ces différenciations guidées sont représentées **figure I17**. Il est à noter que les tentatives de différenciation dans le lignage endodermique s'avèrent peu fructueuses probablement à cause du manque de marqueurs de progéniteurs précoces de l'endoderme.

La différenciation guidée vers les lignages mésodermique et cardiaque sera développée dans la deuxième partie de l'introduction.

1.3 Utiliser les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires représentent une source potentiellement illimitée en cellules différenciées, euploïdes et non-transformées pour étudier les fonctions normales et pathologiques de ces cellules et ainsi pallier aux problèmes de culture ou d'inadéquation avec la réalité imposés par les cellules primaires et les lignées de cellules transformées, sources de cellules disponibles jusqu'alors.

L'accès aux cellules des premiers stades de la vie ouvre de multiples possibilités d'investigation dans les domaines de recherche fondamentale sur le développement embryonnaire humain, la thérapie régénérative, la toxicologie et la recherche de médicaments (**figure I18**).

La difficulté principale de l'utilisation de ces cellules ES est la mise au point de conditions de culture standardisées et reproductibles : maîtrisées, les cellules ES pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques et pour la recherche. La modélisation des tissus humains en vue de tester des médicaments ou des substances d'intérêt industriel ayant une toxicité potentielle pourrait être développée à moindre frais (Fagniez, rapport « cellules souches et choix éthiques », juillet 2006).

Voie	Méthode <i>in vitro</i>	Cellules obtenues	auteurs
Cerveau	Formation corps embryoïdes + culture sur différents supports, dans différents milieux ajout facteurs trophiques	Précurseurs neuraux Synthèse neurotransmetteurs (NT) Réponses à stimulation par NT Electriquement actifs	(Carpenter et al. 2001)
	Isolement cellules parties en différenciation spontanée NCAM+ Formation neurosphères progéniteurs neuraux capables de proliférer et se différencier	Neurones matures Cellules gliales	(Reubinoff et al.2001)
	Corps embryoïdes + facteurs trophiques au cours des étapes de différenciation	Neurones dopaminergiques	(Park et al. 2004)
	Co-culture sur MS5 (moelle osseuse souris) formation de rosettes	Neurones dopaminergiques en grande quantité	(Perrier et al. 2004)
	Rosettes, cellules pax-6+ Sox-1- (précurseurs précoces) cultivées sur laminine+acide rétinoïque+Sonic Hedgehog	Motoneurones	(Li et al. 2005)
Peau	Corps embryoïdes	kératinocytes	(Green et al. 2003; Iuchi et al. 2006)
Voie	Méthode <i>in vitro</i>	Cellules obtenues	auteurs
Endoderme			
Pancréas	Corps embryoïdes+ insuline, transferrine, sélénium, fibronectine, FGF, nicotinamide, glucose	Groupes de cellules types îlots de Langerhans	(Segev et al 2004)
foie	Corps embryoïdes + byturate de sodium	Cellules exprimant marqueurs hépatocytaires	(Rambhatla et al. 2003)
	Sélection morphologique dans les colonies de cellules hES, milieu de différenciation	Cellules exprimant marqueur foie fœtal GCTM-5	(Stamp et al. 2005)
Trophoblaste	Culture en faible densité sur Matrigel, milieu conditionné sur MEF+FGF2+BMP4 BMP2 GDF5	Dérivés extraembryonnaires Cellules sécrétrices de gonadotropine chorionique, oestradiol, progésterone	(Xu et al. 2002)

Tableau IT1 : Récapitulatif des essais de différenciation des cellules hES dans la voie ectodermique, endodermique et trophoblastique

1.3.1 Sources

Les lignées de cellules hES sont dérivées à partir de la masse interne de blastocystes de 5 à 7 jours. Ces blastocystes peuvent provenir :

- 1) d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* conçus dans le cadre d'une assistance médicalisée à la procréation, et dont les caractéristiques ne sont pas compatibles avec une congélation.
- 2) d'embryons congelés, pour lesquels il n'y a plus de projet parental.
- 3) d'embryons pour lesquels toute implantation ultérieure est exclue par le biais d'un diagnostic préimplantatoire, mis en place pour un nombre restreint de maladies génétiques (Mateizel, De Temmerman et al. 2006).
- 4) d'embryons créés par transfert nucléaire. Cette technique consiste à transférer le noyau d'une cellule somatique adulte dans un ovocyte énucléé pour produire des blastocystes. En 2001, des cellules ES de souris ont été produites par ce procédé (Wakayama, Tabar et al. 2001). Chez l'homme, la faisabilité de la technique doit être encore démontrée, et les problèmes éthiques soulevés par l'approche ralentissent les recherches pour l'application chez l'homme, même si les défenseurs du transfert nucléaire ne cessent de clamer qu'il ne peut s'agir de clonage thérapeutique.

Dans les deux premiers cas, on obtient des lignées qui pourront être utilisées à des fins thérapeutiques, aussi bien que pour des recherches fondamentales. Dans les autres cas, les lignées obtenues, porteuses de mutation(s) causale(s) d'une pathologie, sont utilisées dans des études de modélisation pathologique ou encore pour du criblage de médicaments. En ce qui concerne le dernier cas, cela reste au conditionnel, car cette pratique est interdite en France.

Les différentes sources sont représentées sur la **Figure I19**.

1.3.2 Applications biomédicales

La recherche sur le développement humain

Les recherches sur l'embryon humain sont limitées par la disponibilité d'embryons obtenus auprès de la clinique, ce qui réduit les connaissances sur le développement humain aux analyses histologiques de sections de quelques embryons humains et aux analogies avec les

études expérimentales sur le développement embryonnaire murin (Thomson and Odorico 2000).

Les connaissances sur le développement embryonnaire humain sont à approfondir et la recherche fondamentale sur les cellules hES permet d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement embryonnaire mais aussi dans le cas de pathologies et de défauts de développement. La différence entre les modèles animaux et humains est telle qu'il est nécessaire d'étudier l'embryologie humaine à partir d'une recherche fondamentale sur les premières cellules humaines (Fagniez 2006).

La recherche de médicaments

En complément de ces recherches en thérapie régénérative, les cellules hES sont aussi envisagées pour des recherches de molécules actives sur certaines pathologies.

Les études développées autour de la pluripotence des cellules souches et des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération des cellules souches somatiques ont permis de comprendre pourquoi certains cancers étaient récalcitrants aux traitements par chimiothérapie. De fait, des analyses par transcriptome comparant le profil d'expression des cellules souches cancéreuses et des cellules souches normales permettront d'identifier des molécules thérapeutiques qui cibleront spécifiquement les cellules souches cancéreuses sans atteindre les cellules souches normales (Mimeault and Batra 2006). Ainsi, les traitements anti-cancéreux seront plus adaptés tout en étant moins toxiques.

Par ailleurs, l'accès à des embryons exclus lors d'un diagnostic pré-implantatoire permet la dérivation de cellules hES porteuses de mutations causales de maladies génétiques (Mateizel, De Temmerman et al. 2006). Les études menées en parallèle sur des lignées naïves et mutées permettront la mise en évidence de biomarqueurs. La définition d'un biomarqueur est celle d'un gène ou protéine affecté par la maladie sans que cette altération soit nécessairement associée à un symptôme. L'étape de modélisation pathologique, qui consiste à identifier ces biomarqueurs, puis à les valider, précède un criblage à haut débit de banques de molécules. Une étude différentielle sur les deux types de lignées, naïves et mutées, aboutira à une sélection de molécules candidates capables d'agir sur plusieurs biomarqueurs associés à une pathologie dans différents types cellulaires. Cela constituera une première étape dans la recherche de médicaments pour des maladies génétiques rares.

Tests toxicologiques

L'utilisation de cellules souches embryonnaires permet de rendre plus efficaces, moins coûteux et plus acceptables les tests toxicologiques. Les lignées de cellules hES représentent un système dynamique approprié à l'identification de nouvelles cibles moléculaires et au développement de drogues qui peuvent être testées *in vitro* pour la sûreté ou pour prédire/anticiper une toxicité potentielle chez l'homme (Davila, Cezar et al. 2004). L'utilisation des cellules hES répond à un manque de méthodes suffisamment efficaces dans certains domaines de toxicologie *in vitro*, mais aussi en embryotoxicologie où les variations inter-espèces compliquent l'analyse des données. Mais surtout, les dérivés des cellules hES permettent de s'affranchir des tests de pharmacotoxicologie sur les modèles animaux aux physiologies particulières. Les premières approches ont été réalisées avec des cardiomyocytes dérivés de cellules ES de souris, pour tester l'effet de drogues chronotropes (Wobus, Wallukat et al. 1991). Le modèle des corps embryoïdes a permis d'évaluer l'embryotoxicité du thalidomide, un agent tératogène connu (Sauer, Gunther et al. 2000).

La thérapie régénérative

Une des forces des cellules ES réside dans le fait que l'on peut envisager des thérapies de n'importe quel organe ou tissu. En effet, même si l'on n'arrive pas encore à obtenir *in vitro* tous les types cellulaires, en greffant des cellules précurseurs engagées dans un feuillet embryonnaire, on peut raisonnablement considérer que les cellules trouveront *in situ* les facteurs guidant la différenciation terminale. Ainsi, il devient envisageable de soigner des maladies qui aujourd'hui nécessitent des greffes d'organes (maladies cardiovasculaires, leucémies,...) ou des traitements lourds (diabète), voire des maladies pour lesquelles aucun traitement efficace n'existe (maladie de Huntington, d'Alzheimer, ...).

1.3.3 Les limites

Problèmes de culture des cellules

En pratique, l'état indifférencié des cellules hES est assez difficile à maintenir sur le long terme et pour de grandes quantités de cellules.

Les connaissances acquises sur les mécanismes de maintien de cet état indifférencié ne suffisent pas à ce qu'un unique mode de culture ait été proposé et adopté par tous.

On ne maîtrise toujours pas tous les facteurs produits pas les cellules nourricières ou présents dans le sérum, ou encore endogènes, qui favorisent la culture des cellules hES à l'état

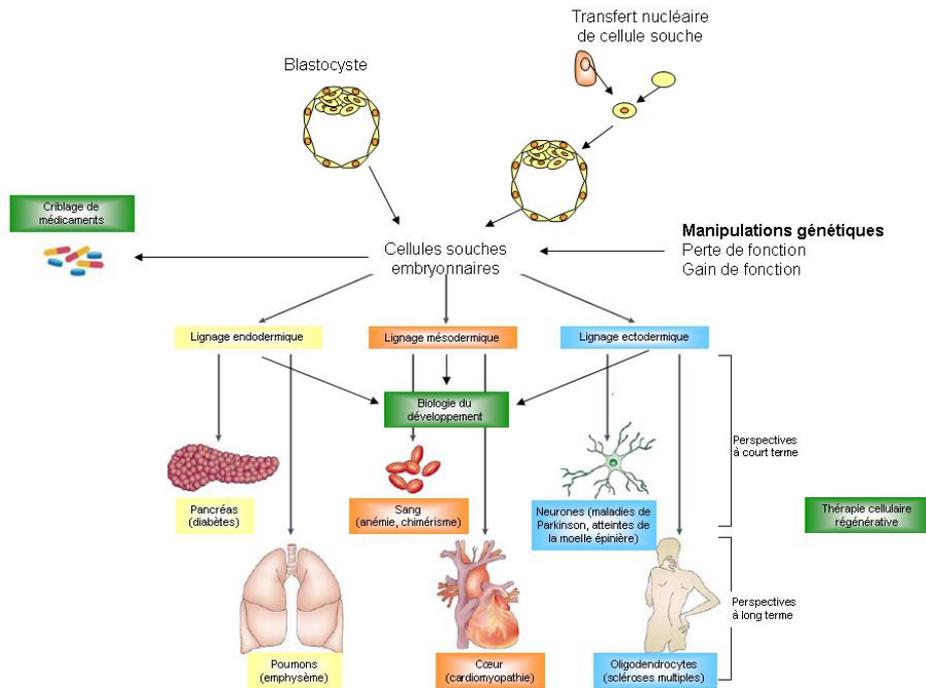


Figure I18 : Protocoles pour générer des tissus spécialisés à partir de cellules souches embryonnaires et perspectives pour leurs applications thérapeutiques (d’après Bradley et al. 2002)

En utilisant le modèle des cellules ES murines, différents essais de différenciation de ces cellules en cellules spécifiques d’un tissu ont montrés que ces dérivés pouvaient s’intégrer dans un tissu cible où elles semblent fonctionner normalement. Ces succès expérimentaux laissent envisager de mener à des succès en essais cliniques à court terme (5-10 ans) pour des tissus/maladies qui peuvent être traités à partir d’un seul type cellulaire isolé, et dans le long terme (>10 ans), pour des tissus/maladies qui requièrent plus d’un type cellulaire pour fonctionner dans une organisation spatio-temporelle. LIF, leukaemia inhibitory factor.

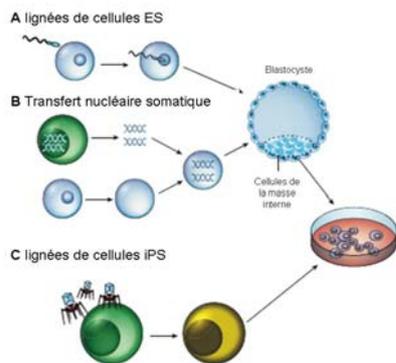


Figure I19 : Sources de cellules souches (d’après Chidgey 2008).

Les cellules souches peuvent être produites et/ou isolées à partir de différentes sources. **A** des lignées de cellules ES sont générées à partir du produit de fusion d’un spermatozoïde et d’un oocyte, qui s’est par la suite développé en blastocyste. La masse interne du blastocyste est extraite et mise en culture dans des conditions de culture spécifiques pour maintenir les cellules à un état indifférencié. **B** le transfert nucléaire somatique implique de retirer le génome d’une cellule somatique (de n’importe quel site d’un individu de n’importe quel âge), et de retirer le noyau (énucléation) d’un oocyte. Le génome de la cellule somatique est ensuite transféré dans l’oocyte énucléé et l’environnement intracellulaire de l’oocyte modifie le profil d’expression du génome de la cellule somatique. Ainsi, la cellule adopte un type cellulaire plus primitif (moins engagé). **C** les lignées de cellules pluripotentes induites (iPS) sont générées par différenciation de cellules somatiques en introduisant des vecteurs rétroviraux porteurs de gènes codant un ensemble de facteurs définis.

indifférencié. Aujourd'hui encore des publications paraissent sur des techniques de culture améliorées, visant la culture sans feeder (Amit 2007; Chase and Firpo 2007) ou la recherche de molécules favorisant la culture des cellules (Watanabe, Ueno et al. 2007; Xu, Shi et al. 2008)

Les bioréacteurs perfusés sont cités régulièrement comme moyen pour améliorer les conditions de culture car, comme il le sera développé plus loin, ils permettent la culture en suspension avec perfusion de milieu. Jusqu'ici, ce système est souvent décrit pour la formation des corps embryoides, mais son utilisation pour la culture des cellules hES à l'état indifférencié pose encore quelques difficultés, notamment celle de conserver l'état indifférencié alors que les cellules s'agrègent naturellement en suspension. Récemment, des cellules hES ont été cultivées en bioréacteur pendant environ 40 passages (110 jours), sous la forme d'agrégats encapsulés dans un hydrogel d'alginate (Siti-Ismaïl, Bishop et al. 2008). Les agrégats encapsulés grossissent au cours de la culture et les cellules sont rendues accessibles par dissolution de l'hydrogel d'alginate, sans avoir à faire subir aux cellules un traitement enzymatique. Ces données sont encourageantes même si elles nécessitent une caractérisation plus approfondie des cellules ainsi cultivées, en particulier pour leur potentiel de différenciation.

De même, le problème d'utilisation de cellules nourricières animales et de milieux de culture comportant des éléments animaux doit être réglé, car de telles conditions de culture représenteraient naturellement des dangers potentiels de contamination par des virus murins ou par des prions d'origine bovine.

En 2005, des chercheurs ont démontré que des anomalies génétiques apparaissent dans des lignées de cellules embryonnaires humaines cultivées *in vitro* de façon prolongée (Maitra, Arking et al. 2005). Ils ont ainsi montré que des changements importants avaient eu lieu : pertes ou amplification de certaines parties de l'ADN, mutations de l'ADN mitochondrial, modification de l'expression des gènes. Les auteurs notent qu'on ne connaît pas encore l'impact de ces mutations génétiques sur le comportement des cellules souches ou sur leur capacité à se différencier. Il semble que les cellules qui accumulent ainsi des modifications de leur ADN, que celles-ci soient d'origine génétique ou épigénétique, acquièrent un avantage prolifératif par exemple, le gène *Nanog* localisé sur le chromosome 17, est retrouvé dupliqué

quasi systématiquement en cas d'anomalie chromosomique, par rapport aux cellules non affectées par ces phénomènes.

Limite de la tumorigénécité

Pour démontrer que des cellules souches embryonnaires sont pluripotentes, on injecte ces cellules chez une souris immunodéficiente, c'est-à-dire dont le système immunitaire a été détruit. On obtient alors des tératomes parce qu'il s'agit d'une souris immunodéficiente et que son système immunitaire ne peut s'en débarrasser. D'après Daniel Aberdam, il est établi que lorsqu'on différencie les cellules souches embryonnaires, on n'obtient plus ces tumeurs. Si l'on arrive à purifier des cellules différenciées à partir de cellules souches embryonnaires, toutes les expériences publiées ou commentées, montrent qu'il y a absence de tumeur. Selon Philippe Ménasché, à partir du moment où les cellules sont pré-différenciées correctement, il n'a pas été observé de tumeur (propos recueillis et reportés dans le rapport de Clayes, 2006).

La première façon d'y parvenir est de purifier les cellules à greffer, à travers une modification génétique des cellules pour exprimer, sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique, un gène de résistance à un antibiotique ou le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein). Une limite à cette approche serait de provoquer un rejet des cellules exprimant du « Non Soi ».

La sélection peut aussi être négative en visant la destruction des cellules indifférenciées qui persisteraient dans la population des cellules greffées par l'utilisation notamment du gène de la Thymidine Kinase (TK) (Schuldiner, Itskovitz-Eldor et al. 2003).

Limite du statut immunologique des cellules hES

L'autre limite souvent évoquée est associée au statut immunologique des cellules souches (**figure I20**). Les différents travaux sur le sujet n'abondent pas tous dans le même sens : les cellules à l'état indifférencié *in vitro* expriment en faible quantité des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histoincompatibilité) de classe I et selon certains, le taux de ces molécules exprimées augmente lorsque les cellules se différencient en corps embryoïdes ou en tératome (Drukker, Katz et al. 2002). D'autres investigateurs observent que le niveau des molécules de classe I diminue après différenciation (Draper, Pigott et al. 2002). En ce qui concerne les molécules de classe II, seuls les travaux de Bradley et collaborateurs mentionnent une augmentation du niveau d'expression de ces molécules à la surface des cellules souches embryonnaires en différenciation *in vitro* (Bradley, Bolton et al. 2002). Même si les résultats concernant le statut immunologique font encore débat, un consensus

existe sur le fait que ces cellules sont immunogènes et que cela est à prendre en compte dans le cadre de la thérapie cellulaire.

Parmi les solutions avancées, en dehors des traitements immunosuppresseurs, la plus récurrente consiste à créer une banque de cellules souches pour minimiser le rejet. Malheureusement, des calculs récents somment à un million le nombre de lignées de cellules ES nécessaires pour avoir de fortes probabilités de compatibilité avec les patients (Lerou and Daley 2005), en considérant le nombre d'haplotypes nécessaires pour rendre compte les différentes combinaisons des 3 gènes du CMH. De plus, il faut tenir compte qu'une seule variation entre le donneur et le receveur au niveau des antigènes d'histoincompatibilité mineurs est suffisante pour induire le rejet.

Dans une revue parue récemment sur les stratégies pour induire une tolérance aux thérapies basées sur l'utilisation des cellules souches, plusieurs approches ont été abordées, pour lesquelles des essais pré-cliniques et cliniques ont été réalisés (Chidgey, Layton et al. 2008). Les stratégies évoquées visent à « rajeunir » le thymus (atrophié chez l'individu post-pubère) pour permettre à de nouveaux lymphocytes T d'être produits pour la reconnaissance des greffes (**Figure I21**).

En inhibant la production de stéroïdes sexuels, il a été montré une restauration du système immunitaire dans une approche clinique de transplantation de moelle osseuse (Sutherland, Goldberg et al. 2005). Cette restauration était accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules du thymus, ainsi que d'un changement de son architecture (Goldberg, Alpdogan et al. 2007; Sutherland, Spyroglou et al. 2008). L'administration de facteurs de croissance agissant sur les cellules épithéliales du thymus comme le KFG, (Keratinocyte Growth Factor) participe aussi à une restauration du thymus chez le rongeur âgé (Min, Panoskaltis-Mortari et al. 2007) et chez le singe, le KGF augmente la restauration de la population de lymphocytes T dépendante du thymus (Seggewiss, Lore et al. 2007). L'administration d'IL-7 ou du FLT3-Ligand (FL) a aussi des effets de stimulation de la production de cellules progénitrices lymphoïdes après transplantation de moelle (Alpdogan, Schmaltz et al. 2001; Wils, Braakman et al. 2007). Tous ces travaux suggèrent que la privation des stéroïdes sexuels et/ou l'administration des facteurs de croissance (seuls ou combinés) constitueraient des adjuvants à la transplantation en permettant l'induction de la tolérance par le receveur des éléments allogéniques.

L'autre cible pour induire la tolérance vise la périphérie, à savoir les cellules dendritiques et les lymphocytes T régulateurs. Cela peut consister à générer des cellules dendritiques tolérologiques (qui prolongent la survie de la greffe). Il a ainsi été montré que la culture de

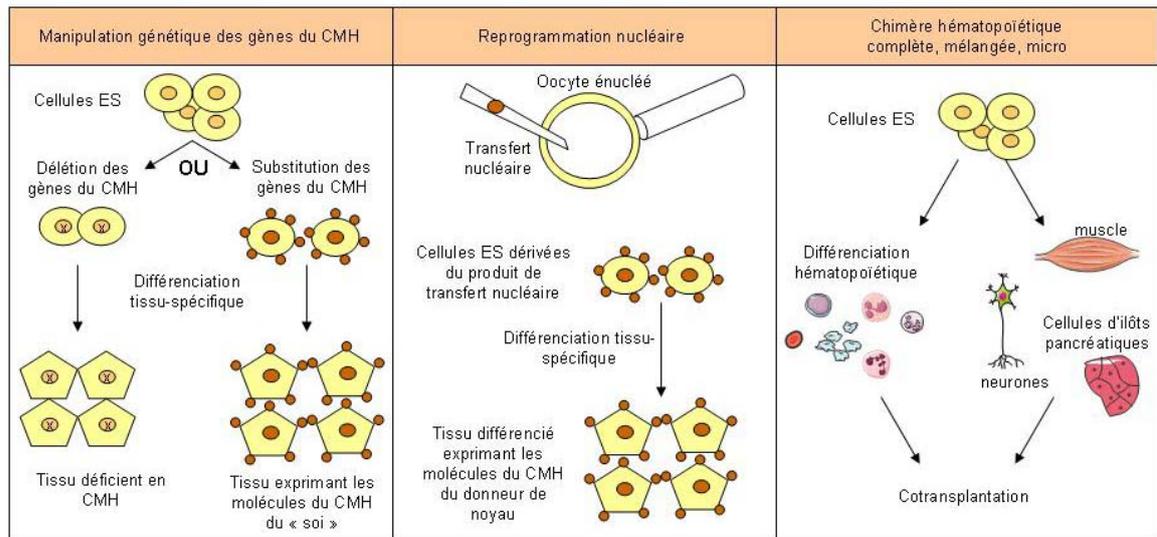


Figure I20 : Les différentes stratégies pour contourner le rejet immunitaire de transplants tissulaires dérivés de cellules hES (d'après Odorico et al. 2001).

A Les cellules ES peuvent être génétiquement modifiées pour soit éliminer les gènes du CMH étrangers, soit remplacer ces gènes étrangers par d'autres compatibles avec l'hôte. **B** Dans la reprogrammation nucléaire, un noyau provenant d'une cellule somatique du receveur peut être reprogrammé par transfert nucléaire dans un oocyte énucléé. La lignée de cellules ES dérivées de l'embryon issu de ce transfert exprime tous les antigènes d'histocompatibilité et autres gènes nucléaires du receveur à partir duquel les cellules somatiques ont été obtenues. **C** Les cellules hématopoïétiques et un autre tissu dérivés des mêmes cellules ES pourraient être transplantés simultanément ou successivement chez le receveur, ceci créerait une chimère hématopoïétique, et donc une immunotolérance serait établie pour le second tissu.

cellules dendritiques en présence de MSC permettait d'obtenir de telles cellules (Zhang, Ge et al. 2004; Jiang, Zhang et al. 2005). Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ suppriment l'activation des lymphocytes T et une étude pré-clinique a montré que ces lymphocytes T régulateurs induisent une tolérance à la transplantation (Joffre, Santolaria et al. 2008). Cette étude montre un chimérisme au niveau de la moelle de patients ayant subi une transplantation combinée de rein et de moelle. Ce chimérisme permet d'inactiver les lymphocytes T reconnaissant les éléments du donneur, et ceci à travers un développement de cellules dendritiques ainsi que par l'activité de lymphocytes T régulateurs retrouvés en très grand nombre dans les cellules transplantées. L'idée serait donc de dériver à partir de cellules ES des cellules dendritiques qui produiraient des lymphocytes T régulateurs spécifiques des cellules ES et de leurs dérivés (Zhan, Dravid et al. 2004).

A travers ces approches et ces très récents travaux, il apparaît des solutions faciles à mettre en place et moins lourdes qu'un traitement immunosuppresseur pour induire la tolérance à la transplantation de cellules ES.

Le transfert nucléaire a aussi été évoqué comme stratégie pour induire la tolérance car cela permettrait aux cellules greffées d'exprimer des cellules du « Soi ». Ainsi, les cellules greffées exprimeront tous les gènes nucléaires du receveur et le risque de rejet sera limité aux gènes mitochondriaux. Des lignées de cellules ES dérivées de blastocystes obtenus par transfert nucléaire ont déjà été obtenues chez la souris (Munsie, Michalska et al. 2000; Wakayama, Tabar et al. 2001). Cependant, chez l'homme, les rares essais autorisés ont été infructueux et de nombreuses oppositions à l'utilisation de cette technique font que les efforts sont concentrés dans d'autres directions.

Ethiques

La loi du 6 août 2004 est une révision de la loi de 1994 qui interdisait la recherche sur l'embryon et qui ne mentionnait pas l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines puisque ces cellules n'étaient pas encore obtenues.

Contexte d'établissement de la loi du 6 août 2004

En France, la loi du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal ne prévoyait

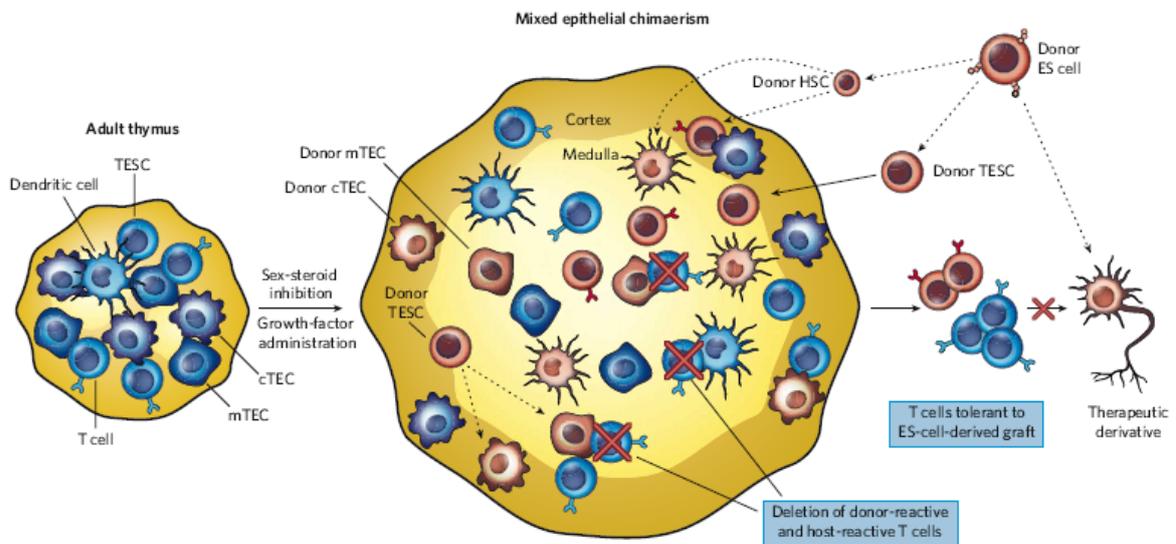


Figure I21: Générer un chimérisme épithélial mixé pour induire la tolérance (d'après Chidgey, 2008)

Après la puberté, le thymus devient remarquablement réduit, ce qui se traduit en des zones médullaires et corticales indistinctes et en une réduction des fonctions thymiques. Réverter cette atrophie induite par le vieillissement, à travers des facteurs de croissance tels que LHRH-A, KGF et des hormones de croissance, peut contribuer à la régénération du thymus à un état qui reproduit la taille et la fonction d'avant puberté. En combinant les thérapies, les cellules épithéliales thymiques (TESC) dérivées des cellules ES, avec les cellules souches hématopoïétiques (HSC), elles-mêmes dérivées des cellules ES, pourraient être administrées par injections respectivement intrathymique et intraveineuse. Dans l'environnement thymique rajeunissant, les TESC peuvent se différencier à la fois en cellules épithéliales corticales (cTEC) et médullaires (mTEC), et les HSC peuvent se différencier en cellules dendritiques et précurseurs de cellules T. Les cTEC peuvent réaliser une sélection positive des cellules T avec un TCR fonctionnel ainsi qu'une sélection négative des cellules T qui réagissent aux cellules du donneur et du receveur, ce qui se traduit par une émigration des cellules T tolérantes qui ne sont pas réactives aux antigènes de soi ou du transplant issu du donneur. Les cellules du donneur sont figurées en rouge et celles du receveur en bleu. Les flèches pleines indiquent les mouvements, celles en pointillés indiquent les multiples événements de différenciation qui sont impliqués.

pas de considérer les cellules souches issues de l'embryon¹. En revanche, dans certains pays, les lois antérieures permettaient de répondre, favorablement ou non, à la demande des scientifiques. Le 30 avril 2002, le ministère de la Recherche a autorisé l'importation de cellules hES sur le fondement de l'article L.1245-4 du code de la santé publique² de l'époque qui prévoyait un système d'autorisation pour l'importation et l'exportation de tissus et cellules du corps humain. Cette décision contournait la considération du statut de l'embryon et des cellules souches embryonnaires et a donc fait suite à un déféré devant le tribunal administratif, puis à un pourvoi en cassation suite au rejet de la demande. Ainsi, une première jurisprudence distinguait l'embryon des cellules souches embryonnaires. En 2002, les connaissances scientifiques évoluant plus rapidement que le cadre légal, les chercheurs français ne pouvaient pas rester en marge des autres pays et se priver d'entreprendre des recherches très utiles. A l'époque, les travaux parlementaires d'élaboration de la nouvelle loi relative à la bioéthique étaient seulement en cours. Au moment d'établir la loi du 6 août 2004, les pays voisins proposaient divers exemples de positions quant la législation de l'embryon et des cellules souches embryonnaires. Les parlementaires étaient partagés entre la volonté de permettre de trouver des traitements innovants pour les malades et de développer la recherche, tout en évitant les dérives que l'autorisation de recherche sur l'embryon pouvaient entraîner et que certains envisageaient. La loi du 06 août 2004 relative à la bioéthique conserve donc un principe d'interdiction de la recherche sur l'embryon avec une exception³ car elle autorise de manière dérogatoire, pour 5 ans et dans des conditions strictes, les recherches sur l'embryon et sur les cellules hES (articles L.2151-1 à L.2151-8 du code la santé publique).

Grâce à la révision de la loi relative à la bioéthique, le projet I-Stem a pu se développer et les dérogations du comité, mises en place avant la création de l'Agence de la Biomédecine, ont permis au laboratoire d'être le premier en France à importer et travailler avec des cellules souches embryonnaires humaines en 2005.

¹ L'article L.2141-8 du code de la santé publique alinéa 2, dans sa rédaction de 1994, prévoyait que « Toute expérimentation sur l'embryon est interdite »

² Article L.1245-4 du code de la santé publique (version en vigueur en 2002) : l'importation dans le territoire douanier et l'exportation hors du territoire douanier des tissus et cellules issus du corps humains sont soumises à autorisation et seuls peuvent importer ou exporter des tissus ou cellules des organismes autorisés par l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

³ Article L.2151-8 alinéa 3 : par dérogation au 1^{er} alinéa, et pour une période limitée à 5 ans à compter de la publication du décret en Conseil d'Etat prévu, l'article L.2151-8, les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à condition de ne pouvoir être poursuivie par une autre méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques. Les recherches et les protocoles qui ont été autorisés dans ce délai de 5 ans et qui n'auraient pu être menés à leur terme dans le cadre dudit protocole peuvent néanmoins être poursuivis dans le respect des conditions du présent article, notamment en ce qui concerne leur régime d'autorisation.

Les conditions encadrant la recherche

La loi a balisé les conditions de recherche sur les cellules embryonnaires avec nombre de conditions et de restrictions concernant les procédures d'autorisation, conservation ainsi que l'importation et l'exportation des cellules souches embryonnaires. Après le vote de la loi, un dispositif transitoire a été mis en place, avant la création de l'Agence de la Biomédecine dont les rôles aujourd'hui sont d'autoriser par dérogation les équipes de recherche, d'encadrer les travaux de recherche d'un point de vue légal et éthique, et enfin d'évaluer les recherches et établir un bilan au terme des cinq années de dérogation.

- Procédure d'autorisation et de conservation.

Depuis le décret du 06 février 2006, l'Agence de la Biomédecine délivre donc toutes les autorisations valables pour 5 ans maximum, en se basant sur le principe que la recherche n'est autorisée que si elle est susceptible de permettre des progrès thérapeutiques majeurs, c'est-à-dire à visée thérapeutique, pour le traitement de maladies particulièrement graves ou incurables.

L'agence de la Biomédecine contrôle aussi la provenance des cellules hES. En effet, la loi prévoit que les cellules doivent provenir d'embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* conçus dans le cadre d'une assistance médicalisée à la procréation, ou d'embryons pour lesquels toute implantation ultérieure est exclue par le biais d'un diagnostic préimplantatoire. Le consentement préalable écrit des parents est nécessaire. Ainsi, il est interdit de créer des embryons à des fins de recherche.

- Conservation

Les organismes assurant la conservation ne peuvent céder les cellules embryonnaires humaines qu'à un organisme autorisé à conserver ou dont le protocole de recherche a été approuvé. L'Agence de la Biomédecine est informée préalablement de toute cession.

- Importation et exportation

L'exportation n'est possible que si un organisme de recherche français participe à un programme de recherche international. En ce qui concerne l'importation, l'Agence de la Biomédecine vérifie sa provenance selon les mêmes exigences que pour des cellules obtenues en France. Elle s'intéresse aussi aux informations données aux patients qui consentent à donner leur(s) embryon(s) à la recherche. La demande d'importation s'accompagne d'un exemplaire de la loi étrangère autorisant les recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires humaines ou d'un exemple type d'un formulaire de consentement présenté au

couple donneur. Ainsi, le laboratoire demandeur ne peut s'abstraire des considérations éthiques.

Le cadre spécifique français de la recherche sur les cellules souches embryonnaires est restrictif. Les restrictions s'expliquent par les implications idéologiques auxquelles renvoie la recherche sur l'embryon. Sont alors en balance la protection de l'embryon et le droit des malades à bénéficier de nouvelles thérapeutiques.

Problème éthiques liés au transfert nucléaire*

Dans la loi du 6 août 2004, le terme correspondant au transfert nucléaire est le clonage thérapeutique. Interdit en France, le clonage thérapeutique soulève plusieurs questions.

Le produit cellulaire issu d'un transfert nucléaire peut-il être considéré comme un embryon?

Auquel cas, se pose le problème de l'instrumentalisation de l'embryon qui est alors créé à des fins d'utilisation pour la recherche.

Trois points de vue s'opposent quant à une considération du produit du transfert nucléaire. Pour certains, il s'agit d'un embryon et ne doit pas faire l'objet de traitements différents. Même s'il n'est pas issu de la fusion de deux gamètes, ce n'est pas le mode de conception qui est pris en compte mais le potentiel d'humanité. Pour d'autres, les embryons issus de transfert nucléaire ne peuvent pas être considérés comme des embryons naturels du fait de leur incapacité génétique à aboutir à un individu complet et viable. Enfin, le dernier point de vue ne prend en compte que le mode de création des embryons au détriment de leur « potentiel d'humanité » : ne résultant pas de la fusion de deux gamètes mâle et femelle, le produit cellulaire issu de transfert nucléaire ne peut être considéré comme un embryon naturel. Il s'agirait d'un simple amas de cellules dont l'étude ne pose alors aucun problème particulier. On devrait alors parler d'un « artefact », d'un « pseudo embryon » ou encore d'une « unité embryonide ». On trouve aussi des appellations des scientifiques eux-mêmes d'« unités de transferts nucléaire » ou de « blastocystes de transfert nucléaire ».

* Le développement de cet aspect est largement inspiré du rapport du député Alain Clayes, *Les recherches sur le fonctionnement des cellules humaines* 2006.

Les perspectives thérapeutiques et scientifiques peuvent-elles encore, à elles seules, justifier la prise de risques ?

En effet, de nombreuses incertitudes demeurent. La première est associée au risque de la première étape vers le clonage reproductif. La différence entre ce type de clonage et le clonage thérapeutique réside dans la différence de finalité du produit.

Une autre incertitude concerne la possibilité non exclue d'instrumentalisation des femmes. Cette instrumentalisation est une notion qualitative plus que quantitative. Le risque de marchandisation des ovocytes n'est pas nul, mais peu probable. En revanche, les femmes, réduites à l'état de potentielles donneuses d'ovocytes pourraient subir une pression psychologique du fait de la rareté de ceux-ci alors que les besoins pour un transfert nucléaire, compte tenu du faible rendement chez l'animal, s'annoncent importants. Une additionnelle instrumentalisation de la jeunesse au profit de la vieillesse pourrait aussi être évoquée pour faire valoir le droit de bénéficier de cellules jeunes.

Enfin, l'atteinte au principe de solidarité qui sous-tend le don d'organes est aussi abordée dans les questions soulevées par le transfert nucléaire. Le don d'organe représente un vecteur de solidarité et transcende l'individualisme des sociétés. Or le transfert nucléaire tendrait à une individualisation des traitements et n'appellerait à aucun mécanisme de solidarité hormis celui de la sujétion féminine sollicitée. Cela aboutirait à un bouleversement des principes fondamentaux de nos sociétés avec des conséquences néfastes à plus ou moins long terme sur le corps social et les valeurs qui sont les siennes.

De fait, pour justifier le clonage thérapeutique au niveau éthique, sont avancés les arguments des finalités thérapeutique et scientifique. S'il est évident que cette technique permettrait de servir la recherche et d'acquérir des connaissances fondamentales essentielles, pour légitimer la transgression de l'interdiction de création d'embryon à des fins thérapeutiques, il faut établir des critères qui fassent consensus pour déterminer si la balance bénéfices thérapeutiques/ risques est positive

Les prises de position des instances consultatives et de l'Agence de la biomédecine

Le CCNE (Comité Consultatif National d'Éthique) se prononce favorable à l'utilisation des cellules souches embryonnaires en raison des perspectives thérapeutiques qu'elles promettent ainsi que pour le clonage thérapeutique, même s'il recommande la prudence en cette matière.

En revanche, l'autre grande instance d'éthique française, la CNCDH (Commission Nationale Consultative des Droits de l'Homme), si elle est aussi favorable aux recherches sur les cellules souches embryonnaires en raison des perspectives thérapeutiques envisagées, s'oppose au transfert nucléaire. La raison avancée est le risque prégnant d'instrumentalisation des femmes à travers le don d'ovocytes.

L'Académie des Sciences et l'Académie de Médecine ont une position commune quant aux recherches sur les cellules souches embryonnaires et sur le transfert nucléaire. Elles se disent en faveur de leur autorisation au vu des perspectives thérapeutiques qu'elles estiment majeures.

Le GEE (Groupe Européen d'Ethique) se prononce favorable aux recherches sur les cellules souches embryonnaires mais estime que l'autorisation du transfert nucléaire est prématurée étant donné qu'il existe un vaste champ de recherches à explorer à l'aide d'autres sources de cellules souches humaines : à partir d'embryons surnuméraires, de tissu foetal et de cellules souches adultes.

Enfin, l'Agence de la biomédecine déclare que la souveraineté décisionnelle relève de la représentation nationale à qui il appartient de discerner entre l'exigence de tout entreprendre pour aider les malades et celle de préserver le sens de l'humain en évitant la dérive de l'instrumentalisation. La représentation nationale s'est donnée le temps du discernement par le moratoire de cinq ans inscrit dans la loi relative à la bioéthique.

En plus de ces problèmes d'éthique, des limites techniques sont apparues au cours des années qui ont suivi leur découverte.

1.4 Une alternative : La reprogrammation cellulaire et les cellules souches pluripotentes induites (iPS, induced pluripotent cells)

A l'issue d'une expérience de fusion entre cellule ES et cellule neurale démontrant que le phénotype ES est dominant sur le phénotype neural (Cowan, 2005 #36), des scientifiques ont cherché quels gènes étaient responsables de ce phénotype indifférencié dominant en les introduisant dans des cellules somatiques. Par la suite, une équipe a provoqué une expression ectopique de quatre facteurs de transcription Oct4, Sox2, c-Myc et Klf4, les deux derniers étant impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des cellules embryonnaires murines

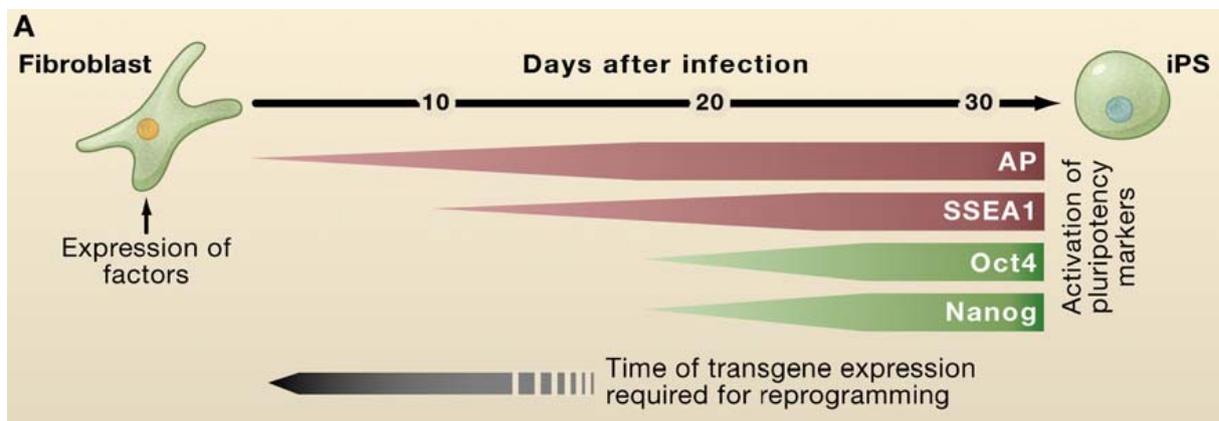


Figure I22 : la reprogrammation implique une activation séquentielle des marqueurs de pluripotence et des évènements épigénétiques stochastiques (d'après Jaenisch & Young 2008).

Cinétique d'apparition des marqueurs de pluripotence. Les cellules positives pour l'alkaline phosphatase (AP) et SSEA1 sont déjà détectées au bout de 3 jours et 9 jours respectivement, après transduction des facteurs de transcription, alors que les cellules exprimant la GFP sous contrôle des promoteurs d'Oct4 ou Nanog, n'apparaissent qu'au bout de deux semaines. Les facteurs transduits doivent être exprimés pendant deux semaines pour initier la reprogrammation cellulaire.

(Cartwright, 2005 #57; Pevny, 1997 #77; Li, 2005 #58) et ainsi reprogrammé des fibroblastes de souris (Wernig, 2007 #55). Le protocole consistait à utiliser des cellules génétiquement modifiées pour exprimer un gène de résistance à un antibiotique sous le contrôle du promoteur d'*Oct4* ou de *Nanog*. Les différentes constructions virales ont été introduites dans ces cellules génétiquement modifiées (**Figure I22**). Par cette expérience, les auteurs ont montré qu'en forçant les boucles de rétrocontrôle positif à fonctionner dans le sens du maintien de l'état indifférencié par surexpression des gènes du maintien de la pluripotence, les cellules ainsi traitées montrent des caractéristiques génétiques et épigénétiques proches des cellules souches embryonnaires. Ces cellules sont appelées cellules souches pluripotentes induites ou induced-pluripotent stem (iPS) cells.

Très récemment, ces travaux ont été réalisés à partir de fibroblastes humains (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Les cellules iPS humaines obtenues sont très similaires aux cellules hES en termes de morphologie, prolifération, de marqueurs de surface, d'activité télomérase, d'expression génique, et du statut épigénétique des gènes spécifiques des cellules pluripotentes. De plus, les auteurs ont montré que les cellules pouvaient se différencier en des types cellulaires des trois feuilletts embryonnaires *in vitro* et pouvaient former des tératomes (Takahashi, Tanabe et al. 2007; Yu, Vodyanik et al. 2007).

Aujourd'hui, des efforts sont apportés à 1) l'amélioration dans le protocole (augmenter le rendement en colonies ES-like, diminuer le nombre de vecteurs introduits), 2) obtenir des cellules iPS à partir de différents types de cellules somatiques différenciées (à partir de cellules β du pancréas (Stadtfield, Brennand et al. 2008) et 3) différencier les iPS dans différents lignages, notamment le lignage cardiaque (Schenke-Layland, Rhodes et al. 2008).

Ces approches de reprogrammation permettent d'autre part d'aborder la compréhension des mécanismes du maintien de la pluripotence, et, au niveau épigénétique, des mécanismes mis en œuvre pour réguler les changements de conformation de la chromatine, ainsi que des gènes impliqués.

Par la suite, le laboratoire de Georges Daley a montré qu'il était possible d'obtenir ces cellules iPS à partir de fibroblastes isolés d'une biopsie de peau (Park, Arora et al. 2008). Ces travaux ouvrent alors des perspectives d'application de ces méthodes à des patients atteints de maladies spécifiques. De plus, les travaux de ce laboratoire ont apporté la preuve de concept qu'il est possible de combiner thérapies génique et cellulaire en procédant à une recombinaison homologe dans des cellules ES issues de blastocystes obtenus par transfert nucléaire (Rideout, Hochedlinger et al. 2002). Les perspectives thérapeutiques autologues

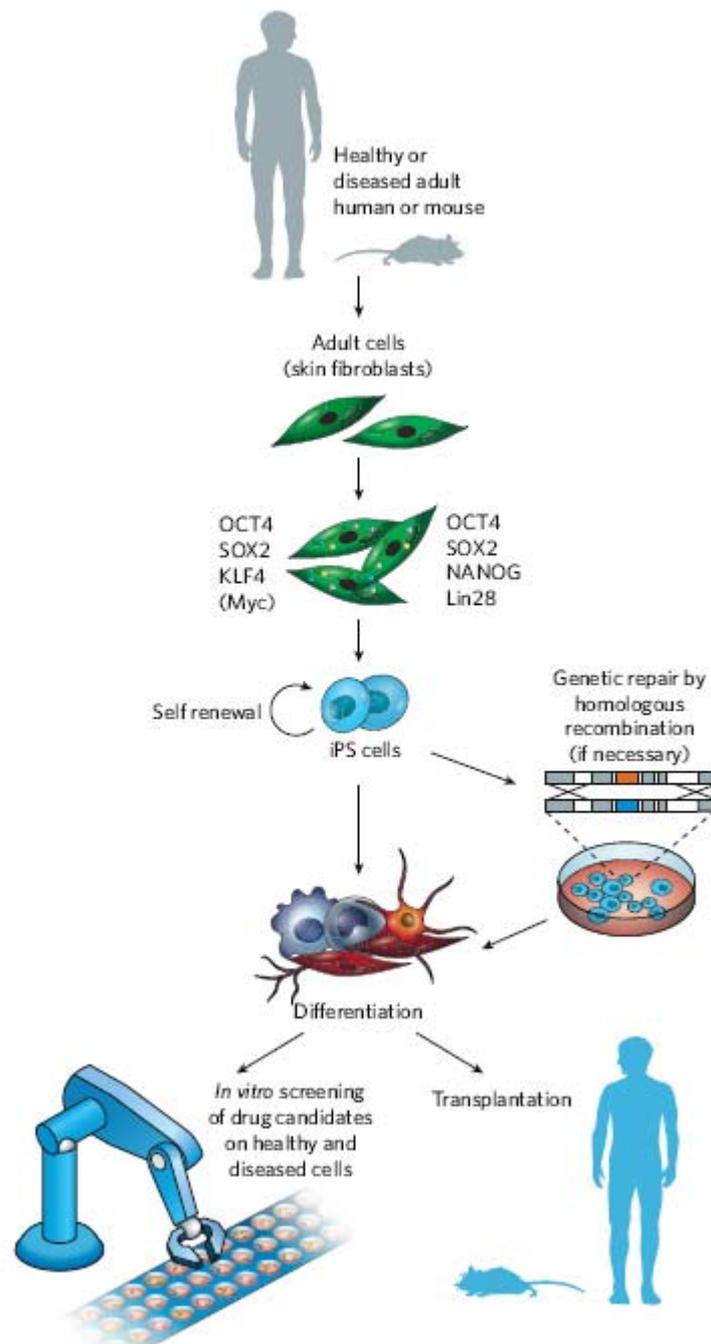


Figure I23 : les cellules iPS et la thérapie de transplantation (d'après Passier et al. 2008)

(**figure I23**) sont donc envisageables, si tant est que les problèmes de tumorigénécité peuvent être résolus.

D'autre part, les auteurs de ces travaux suggèrent que l'obtention de cellules souches ne passera peut-être désormais plus par l'obtention de cellules embryonnaires, évitant le problème éthique posé par l'utilisation de cellules embryonnaires et le moratoire sur ce type de recherche décrété par les gouvernements de nombreux pays.

Mais ces travaux préliminaires ne permettent pas d'envisager une utilisation thérapeutique. Les experts pensent que la comparaison des cellules iPS et des lignées de cellules souches embryonnaires existantes doit être conduite de façon plus approfondie, afin de s'assurer que ces nouvelles cellules iPS sont bien des cellules souches. D'autre part, l'utilisation de rétrovirus pour induire l'expression de ces quatre gènes pose le problème de sécurité d'une insertion du génome viral dans un gène critique pour le bon fonctionnement de la cellule (gène suppresseur de tumeur par exemple), et la dérive de ces cellules en cellules tumorales. Un autre problème concerne C-MYC. En effet, une certaine proportion des souris chimères obtenues par introduction de cellules iPS dans des blastocystes murins mourait de tumeurs (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). Cette tumorigénécité a été associée à l'introduction de MYC et pour réduire ce risque, la reprogrammation a été tentée sans MYC sur des fibroblastes murins et humains. Des cellules iPS ont été obtenues, de manière moins efficace mais plus spécifique, avec une tumorigénécité visiblement réduite sur la période étudiée (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008).

De nombreuses équipes travaillent déjà à résoudre ce problème en utilisant des systèmes où les gènes ne s'insèrent pas, mais sont exprimés temporairement, pendant 4 semaines, le temps de lancer une reprogrammation de ces cellules adultes en cellules souches (Bosnali and Edenhofer 2008).

Un autre avantage a été récemment mis en avant par l'équipe de Georges Daley qui a obtenu des cellules iPS provenant de personnes atteintes de maladies génétiques (Park, Arora et al. 2008). On peut alors envisager d'avoir accès à des cellules reprogrammées porteuses de maladies autres que celles recherchées lors de diagnostic pré-implantatoire (notamment la Dystrophie Musculaire de Duchenne) et ainsi, le panel de cellules porteuses de mutations s'élargit sans passer par le transfert nucléaire qui pose des problèmes éthiques et techniques.

Les cellules iPS constituent donc une petite révolution pour l'utilisation thérapeutique de cellules souches, qui pour certains, permettraient de s'affranchir des limites éthiques des cellules souches embryonnaires. La différenciation de cellules souches iPS par l'une des

équipes en cellules cardiaques formant un agglomérat se contractant de façon rythmée, comme un cœur (Schenke-Layland, Rhodes et al. 2008) fait pourtant se poser de nouvelles questions sur la limite entre les cellules embryonnaires, la capacité à donner la vie, et les cellules souches iPS.

Tableau IT3 : Les différentes cardiopathies

Type d'atteinte cardiaque	Causes	Traitement
Angine	Obstruction des vaisseaux	Changement mode de vie, prise de médicaments, chirurgie
Arythmie	Maladie du nœud sinusal, anomalie du bloc cardiaque dans la conduction du signal électrique	idem
Athérosclérose	Causes peu connues Dépôt de cholestérol, calcium et autres substances contre paroi interne de l'aorte	idem
Cardiomyopathie	Infection virale, affection du tissu conjonctif, mais dans la plupart des cas, la cause reste inconnue	Idem
<u>Dilatée</u> (congestive)	Héréditaire-anomalie congénitale	Médicaments administrés : inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine, beta-bloquants, inhibiteurs des canaux calciques La chirurgie peut consister en une greffe de cœur
<u>Hypertrophique</u>	Maladie coronarienne, crise cardiaque	
<u>Restrictive</u> (étirement incomplet du cœur) <u>Ischémique</u> (perte ou affaiblissement du tissu musculaire)		
Cardiopathie congénitale 1% de naissances vivantes	Développement embryonnaire anormal. cause inconnue	Prise de médicaments chirurgie
Insuffisance cardiaque	Angine, maladie ayant causé une lésion du muscle cardiaque, maladie du muscle de cause inconnue	Prise de médicaments Chirurgie : cardiomyoplastie, chirurgie de pontage coronaire, pompe cardiaque, greffe de cœur, stimulateur cardiaque implantable
Maladie coronarienne		Prise de médicaments
Blocage cardiaque	Voir arythmie	Prise de médicaments
Endocardite infectieuse (bactérienne)		Prise de médicaments
Syndrome de Kawasaki	Anévrisme provoquant une crise cardiaque Cause inconnue	Prise de médicaments
Syndrome du QT long Anomalie du système électrique cardiaque.	héréditaire	Prise de médicaments Implantation d'un défibrillateur cardiovertueu implantable
Syndrome de Marfan Affection du tissu conjonctif	héréditaire	Incurable Beta-bloquants pour contrôler la pression artérielle Remplacement d'une valvule cardiaque
Péricardite Infection du péricarde aigue ou chronique	Infection virale ou bactérienne	Changements mode de vie, prise de médicaments, chirurgie
Cardiopathie rhumatismale	Troubles cardiaques aigus ou chroniques qui peuvent survenir à la suite d'une fièvre rhumatismale	Si affection précoce, prise quotidienne d'antibiotiques
Troubles valvulaires	Viellissement Maladies cardiaques congénitales Cardite rhumatismale	Modification du mode de vie Prise de médicaments Chirurgie : prothèse valvulaire mécanique, allo ou xéno greffe de valvules traitées (bioprothèse valvulaire)

2 La thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque associée à la myopathie de Duchenne

2.1. L'insuffisance cardiaque associée à la DMD

La thérapie cellulaire à partir de cellules souches est une réalité expérimentale et les résultats de thérapie dans le contexte de l'infarctus du myocarde sont très prometteurs. C'est effectivement le modèle pathologique le plus couramment étudié car il représente l'atteinte cardiaque la plus fréquente dans les pays industrialisés. Pourtant, ce n'est pas la seule atteinte cardiaque, il en existe de nombreuses autres récapitulées dans le **tableau IT3**. Les phénomènes de dégénérescence observés lors d'une ischémie cardiaque et dans la cardiopathie associée à la maladie de Duchenne sont très différents et nécessitent donc d'adapter les méthodes d'obtention et de transfert des cardiomyocytes à partir des hES.

2.1.1. La cardiomyopathie associée à la Dystrophie Musculaire de Duchenne

La myopathie de Duchenne (DMD) touche environ 1 garçon sur 3500. Elle est associée à un défaut de la dystrophine, protéine présente dans le cytosquelette de toutes les cellules musculaires. Sans elle, la fibre musculaire ne peut plus résister aux forces exercées lors de la contraction, et elle finit par dégénérer, ce qui explique qu'un déficit en dystrophine induit une atrophie musculaire progressive (**figure I24**). Le déficit en dystrophine atteint aussi les cardiomyocytes aboutissant à une perte cellulaire majeure pouvant conduire à l'apparition dès l'adolescence d'un tableau d'insuffisance cardiaque et d'une mortalité précoce. Les patients atteints de DMD montrent des signes de cardiomyopathie très tôt, 25% avant l'âge de 6 ans, mais les signes cliniques de faiblesse cardiaque peuvent être absents en raison d'une activité physique réduite par la faiblesse musculaire (McNally 2007). La maladie touche le cœur avec des degrés variables selon les patients, allant de l'anomalie cardiaque à de sévères anomalies du rythme, des cardiomyopathies dilatées jusqu'à la faiblesse cardiaque menant à la mort. D'un point de vue anatomique, la maladie se traduit par un remplacement des cardiomyocytes et du système de Purkinje par du tissu conjonctif et du gras (Finsterer and Stollberger 2003). Malgré les degrés différents d'atteinte, les patients sont considérés dans le continuum de leur maladie, du fait de la nature progressive de la pathologie.

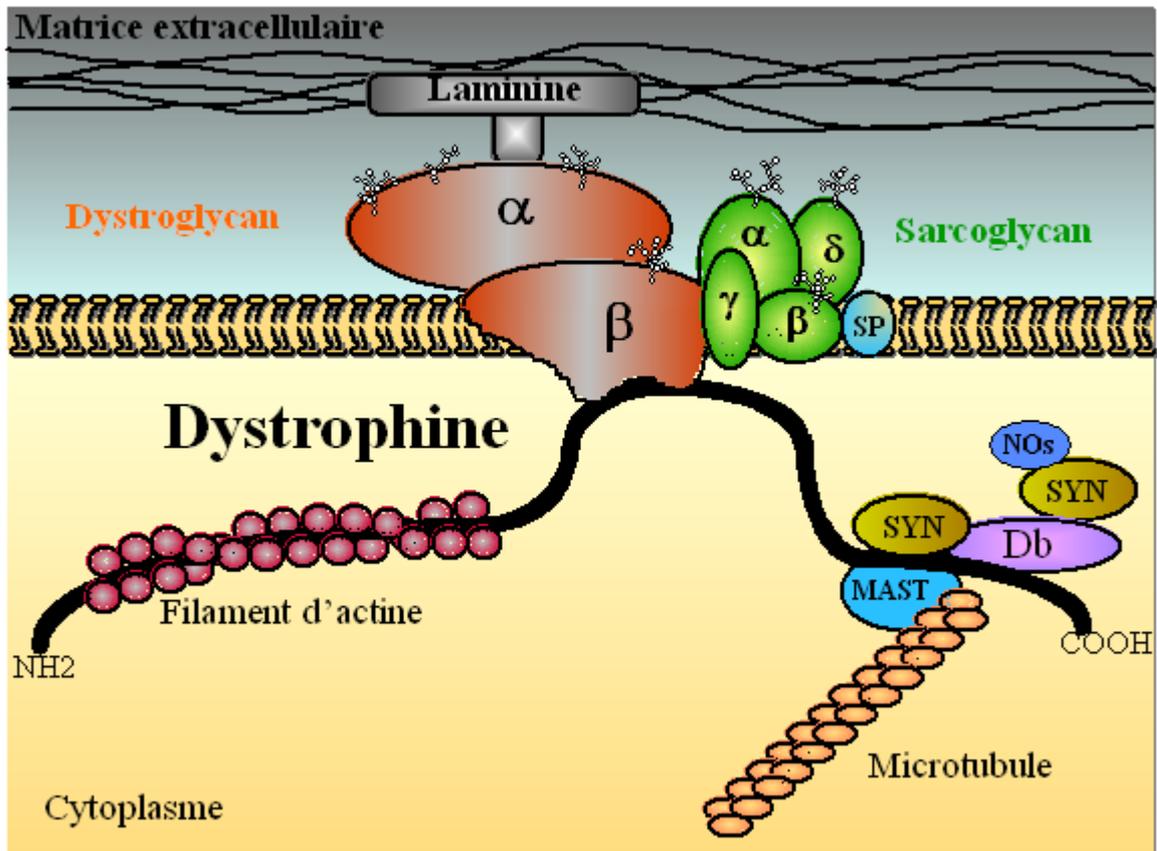


Figure I24 : *Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine*, (inspiré de Straub et al. 1997)

SP : Sarcospan, SYN : Syntrophine, Db : Dystrobrevine, NOs : « Nitric oxyde synthase », MAST : « Microtubule-associated serine/threonin kinase ».

Les défis sont multiples dans le cadre de cette maladie : les sujets sont des enfants ou des adolescents, le choix des actes médicaux doit en tenir compte, et il ne s'agit pas de coloniser une partie entière d'un cœur largement fibrosé, mais de greffer des cellules capables de proliférer et de se différencier pour établir des contacts avec les cellules avoisinantes. De plus, une greffe de cellules autologues est inenvisageable puisque aucune cellule de l'organisme ne peut exprimer la dystrophine.

2.1.2. Modèles DMD

Le premier modèle disponible est représenté par la souris *mdx* (S-linked muscular dystrophy) modèle spontané de la myopathie de Duchenne. Les souris présentent un déficit en dystrophine qui les rend homologues de la mutation observée dans la maladie de Duchenne. Toutefois, ces souris ne perdent pas leurs muscles car elles ne développent pas de fibrose, une prolifération du tissu conjonctif, comme les enfants atteints de la maladie de Duchenne, si bien que les processus dégénératifs causés par la maladie ne l'emportent pas sur la régénération. La plupart des autres muscles ont une histologie peu affectée par la maladie (Dangain and Vrbova 1984) mais le diaphragme des souris *mdx* possède une histologie semblable aux muscles des patients (Stedman, Sweeney et al. 1991). Ce modèle murin ne convient donc pas comme modèle pathologique pour nos études.

Un autre modèle de la DMD est le chien GRMD (Golden retriever muscular dystrophy), modèle spontané de la maladie (Bartlett, Winland et al. 1996). Contrairement à la souris, l'atteinte est très similaire à l'atteinte humaine, notamment parce qu'elle comprend une atteinte cardiaque (Chetboul, Escriou et al. 2004). Cependant, les animaux sont difficilement disponibles par leur petit nombre, et la taille du modèle paraît inappropriée à des études en routine.

Il existe un modèle intermédiaire constitué par le hamster CHF147, déficient en delta-sarcoglycane, qui présente des symptômes de cardiomyopathie très similaires à ceux des patients atteints de DMD (Pouly, Hagege et al. 2004; Seroise, Prudhon et al. 2005). Sa petite taille lui confère un autre avantage par rapport au chien GRMD. Cependant, là encore un problème de disponibilité des animaux atteints restreint les possibilités d'utilisation, surtout pour des expériences de mise au point d'un modèle qui requièrent un nombre conséquent d'expériences.

Les modèles animaux correspondant aux différentes atteintes de myopathie sont résumés dans la **figure I25**

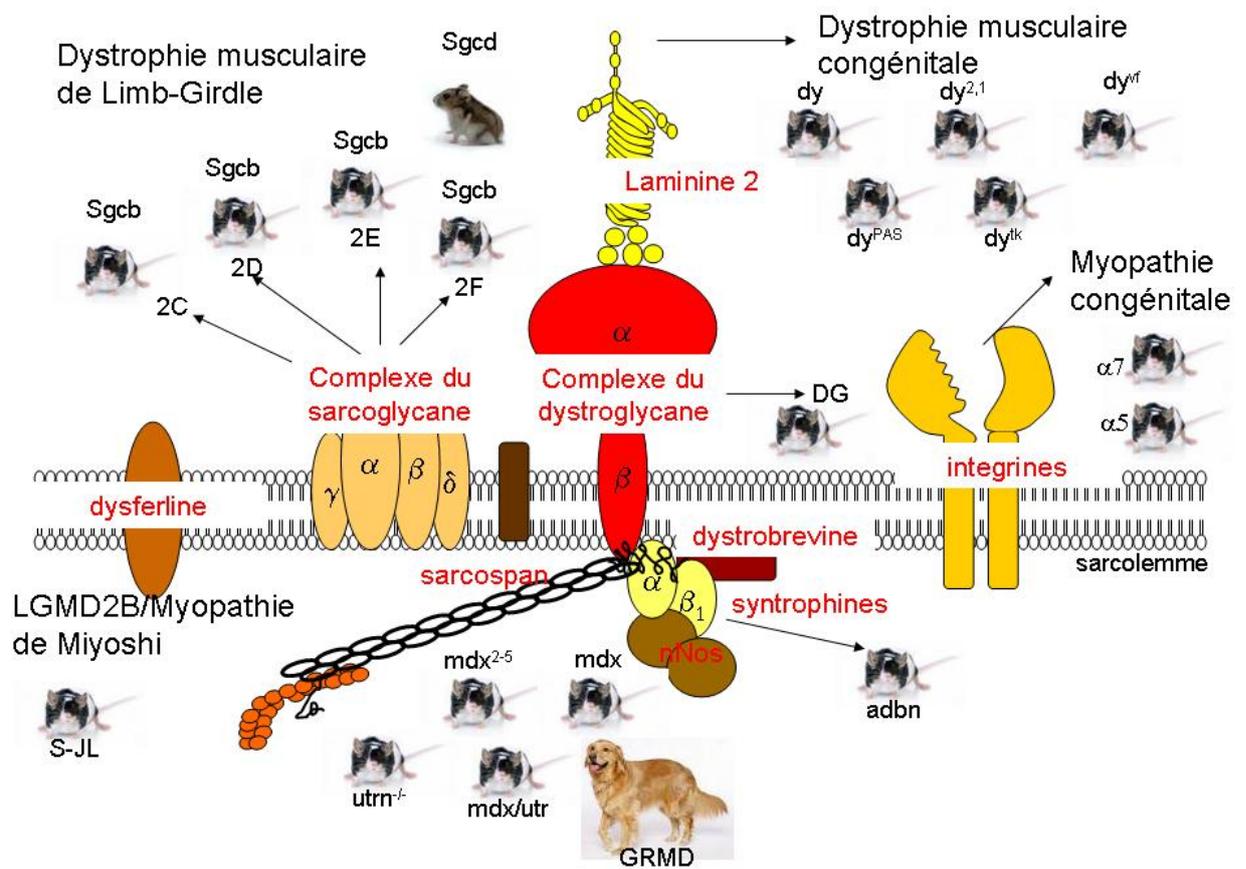


Figure I25: Modèles animaux des dystrophies musculaires (d'après Allamand & Campbell, 2000)

2.2. La thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque

2.2.1. Les modèles d'étude pour la thérapie cellulaire cardiaque

Le cœur est un organe complexe dans lequel les connexions intercellulaires sont cruciales, et où les cellules non-myogéniques, ainsi que la matrice extracellulaire jouent un rôle non négligeable pour assurer la fonctionnalité de l'organe. Les études *in vitro* sur des cardiomyocytes isolés ne peuvent seules appréhender ces notions. Ainsi, dans des perspectives de greffe et d'études pharmacologiques, le besoin d'un modèle reflétant la complexité de l'organe *in vivo* s'est fait de plus en plus ressentir. Par ailleurs, notre volonté d'adresser notre stratégie de thérapie cellulaire à la cardiomyopathie associée à la DMD nous a fait envisager les différents modèles de la pathologie disponibles.

En marge des études sur l'animal entier, qui nécessitent des manipulations chirurgicales souvent lourdes, un accès à une animalerie et l'utilisation du matériel sophistiqué associé, se sont développés différents modèles *in vitro* pour étudier les systèmes cardiovasculaires. Parmi les modèles disponibles décrits dans la revue de Partridge (Partridge, Johnson et al. 2005), est cité celui des tranches organotypiques. En effet, les modèles d'organe perfusé ou de bandes de tissu qui offrent une structure conservée du tissu nécessitent un matériel sophistiqué pour maintenir le matériel en culture. Le modèle des cultures organotypiques de tranches apparaît comme le meilleur par rapport à nos besoins car il permet de s'adresser à une partie de l'organe dans des conditions proches de celles que l'on peut trouver *in vivo* (Gahwiler, Capogna et al. 1997).

Les techniques mises au point pour obtenir des tranches de cerveau ont permis une belle avancée dans la compréhension de l'activité cérébrale parce qu'elles donnaient accès aux cellules nerveuses dans leur environnement préservé (Edwards, Konnerth et al. 1989). Pour ce qui concerne le cœur, il est connu que les relations intercellulaires établies entre les cellules cardiaques jouent un rôle non négligeable dans la fonction de l'organe, tout autant que les cellules non cardiaques et la matrice extracellulaire, présente en grande quantité dans cet organe.

Les premières tranches de cœur ont été développées pour répondre à des besoins d'études physiologiques du cœur inabordables à travers l'étude de cellules isolées (Pillekamp, Reppel et al. 2005). Le cœur a en effet cette particularité d'associer des propriétés électriques et mécaniques. Or les techniques d'isolement et de dissociation des cellules cardiaques altèrent

les cellules en détruisant les récepteurs canaux ioniques présents à leur surface (Pillekamp, Reppel et al. 2005). Les auteurs ont obtenu des tranches de ventricules de cœurs embryonnaires murins dans lesquelles les cardiomyocytes battaient spontanément (Pillekamp, Reppel et al. 2005). La caractérisation des cellules au niveau électrophysiologique montre une bonne qualité des cellules au sein de la tranche. Ils ont montré que ces tranches pouvaient se révéler un outil de criblage pour tester des drogues dans le traitement de maladies congénitales (Pillekamp, Reppel et al. 2005). Par la suite, ils ont appliqué la technique validée au ventricule murin adulte et ainsi ils se placent dans un contexte plus proche de ce que l'on trouve *in vivo* en termes de taille de cellules, de connexions intercellulaires, de distribution des jonctions communicantes ainsi que dans l'organisation des cellules non-myogéniques et de la matrice extracellulaire (Halbach, Pillekamp et al. 2006). Les tranches obtenues sont viables, intactes au niveau électrophysiologique et répondent normalement au traitement par des drogues. Les auteurs ouvrent ainsi la possibilité d'étudier la transplantation de cellules dans ces tranches ou encore d'étudier l'impact de substances pharmacologiques dans un modèle représentatif de la réalité *in vivo* tout en offrant le confort d'un matériel facilement accessible. Cependant, les durées d'études ne vont pas au-delà de 15 jours. Or, pour des études de transplantation de cellules, les cultures doivent être maintenues pendant plusieurs semaines.

La médecine régénérative à partir de cellules suscite des espoirs pour la thérapie de nombreuses maladies pour lesquelles peu de stratégies thérapeutiques sont envisageables ; c'est dans le domaine de la réparation cardiaque que l'impact en santé publique se fera le plus ressentir. L'insuffisance cardiaque devient en effet un problème majeur de santé publique et, avec l'accroissement de la longévité, représentera la première cause de morbidité-mortalité au XXI^e siècle, alors que sa thérapeutique reste inefficace (Vilquin and Marolleau 2004). Aujourd'hui, les médicaments ne font que ralentir la progression des atteintes cardiaques et les interventions chirurgicales ne permettent pas de remplacer le myocarde lésé par un tissu contractile fonctionnel.

2.2.2 Les essais de thérapie cellulaire avec les cellules souches adultes

Les principaux travaux d'essai de greffe ont été réalisés sur le modèle de l'infarctus du myocarde pour les raisons évoqués ci-dessus. Pour se rendre compte de l'ampleur du nombre de cellules à remplacer lors d'un infarctus, il faut considérer que le myocarde contient environ 20 millions de cardiomyocytes par gramme de tissu et que la masse moyenne est de 200g. Un infarctus touche approximativement 25% du ventricule, ainsi, la thérapie cellulaire tend à

remplacer de l'ordre d'un milliard de cardiomyocytes tout en assurant les contractions synchrones *via* les jonctions électromécaniques avec le myocarde hôte (Murry, Reinecke et al. 2006). Bien que la pharmacothérapie pour les maladies cardiaques améliore les effets cliniques, ces modalités de traitement, ainsi que les méthodes d'intervention chirurgicales ont une efficacité limitée parce qu'elles ne permettent pas de réparer ou de remplacer le myocarde endommagé. Au vu des forts taux de morbidité et de mortalité associés aux atteintes cardiaques, ajoutés à la rareté des organes pour la transplantation et les complications conséquentes aux traitements immunosuppresseurs, il est urgent de développer de nouvelles thérapeutiques qui permettent l'amélioration de la fonction cardiaque et la prévention. La régénération ou la réparation du tissu cardiaque peuvent être accomplies par thérapie cellulaire (Laflamme, Gold et al. 2005). Depuis la découverte des cellules souches, des travaux ont émergé utilisant différents types cellulaires, notamment des cellules souches cardiaques, récemment isolées par différentes équipes. Par ailleurs, une approche d'implantation de « morceaux de tissu », issus de l'ingénierie des tissus constitue un domaine de recherche actif et dans lequel les essais de transplantation sont positifs. C'est un domaine fascinant dont les obstacles sont nombreux, mais les efforts fournis ces dernières années pour les surmonter ont permis des avancées époustouflantes. Les résultats des essais de thérapie avec des cellules souches adultes rapportés plus loin sont encourageants bien que le remplacement des cellules cardiaques n'ait pas été observé. C'est en cela que les premiers travaux utilisant les cellules ES sont porteurs d'espoirs (Kehat, Kenyagin-Karsenti et al. 2001; Xu, Police et al. 2002; Laflamme, Gold et al. 2005; Tomescot, Leschik et al. 2007).

Des types cellulaires très différents ont été testés pour la thérapie cellulaire cardiaque en fonction des données sur leur plasticité cellulaire (**tableau IT4**, (Mazhari and Hare 2007)).

Ces essais ont été réalisés à partir des cellules souches adultes précédemment décrites (cellules souches hématopoïétiques, mésenchymateuses,...) car ce sont les premières cellules souches disponibles pouvant répondre au besoin urgent de développer une thérapie cardiaque.

En plus des cellules souches adultes décrites dans la première partie de l'introduction, il apparaît opportun de décrire une autre population de cellules souches adultes dont plusieurs travaux rapportent les tentatives d'isolation et caractérisation.

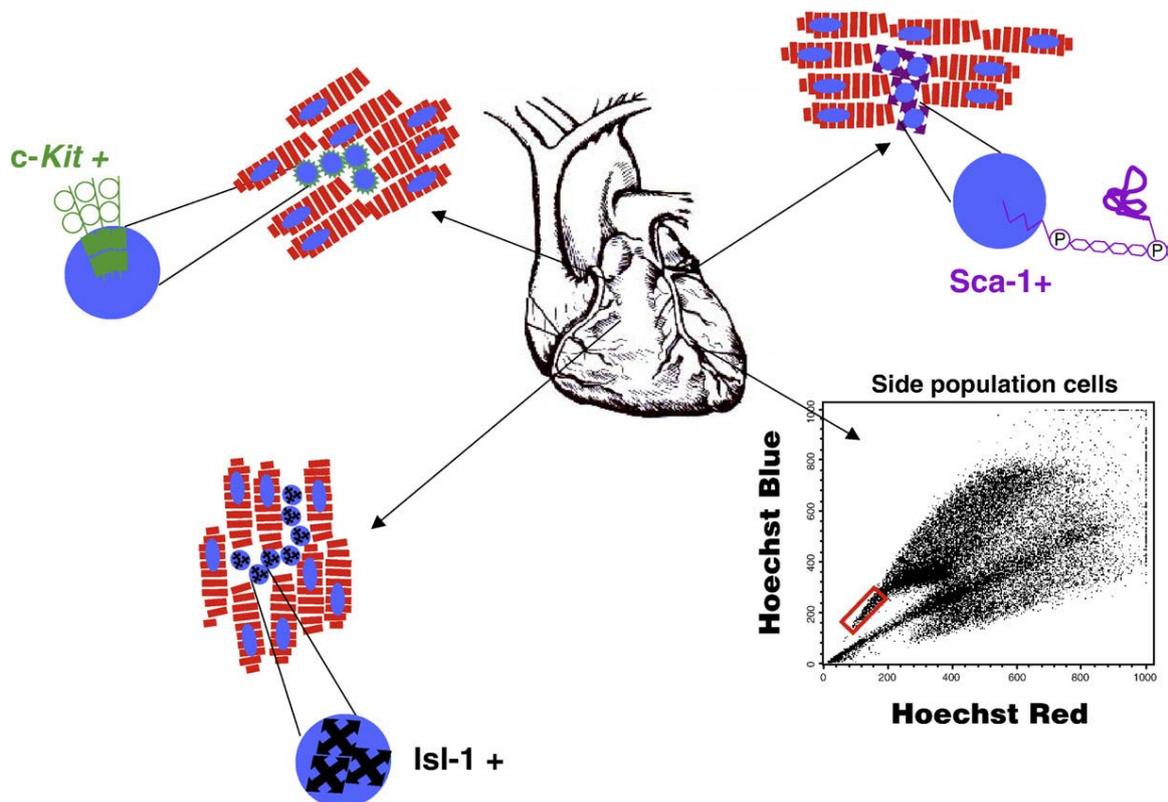


Figure I26: Illustration des quatre types de cellules souches ou progénitrices potentielles endogènes cardiaques (d'après Perino *et al.* 2008).

Chacune des cellules souches « cardiaques » (c-kit, Sca-1 et cellules SP) et des cellules progénitrices (Isl1) ont été décrites comme plutôt petites et rondes. La plupart ont été observées dans les espaces interstitiels, à proximité des cardiomyocytes, mais pour toutes, il a été écrit un potentiel cardiomyogénique. Les cellules de la Side Population, petites et identifiées sur la base de l'exclusion du colorant de Hoechst, sont indiquées dans le rectangle rouge.

Les progéniteurs cardiaques

Alors que jusqu'à récemment, on considérait le cœur comme ne possédant pas de cellules souches résidentes, voilà que différents travaux depuis ces 5 dernières années rapportent la caractérisation de populations de progéniteurs cardiaques isolés à partir de cœurs néonataux ou adultes. Les populations isolées présentent des caractéristiques différentes parce qu'issues d'approches diverses. Plusieurs groupes défendent leur stratégie et de nombreux travaux paraissent pour appuyer les différents points de vue. Ainsi, il y a les défenseurs, soit des cellules de la « Side Population », soit des cellules c-kit⁺, ou Sca1⁺ ou encore Isl1⁺ comme étant des populations de cellules souches ou progénitrices cardiaques résidentes. Ces populations sont représentées sur le **Figure I26**.

Les cellules de la « Side Population » correspondent à des cellules qui excluent le colorant de Hoechst grâce à leurs transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), caractéristique des cellules souches. Elles présentent un profil de tri différent des cellules qui ne possèdent pas ces transporteurs. Cette population sort donc « à côté » de la majorité des cellules triées par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) sur le critère d'exclusion du colorant de Hoeshst (**Figure I26**). Ces cellules, notées par la suite SP, et plus particulièrement celles dépendantes de l'expression du transporteur Abcg2, sont considérées comme des cellules souches/progénitrices qui présentent un auto-renouvellement sur le long terme (Goodell, Brose et al. 1996). Abcg2 est effectivement exprimé dans le cœur (Martin, Meeson et al. 2004). Les cellules peuvent se différencier, et au niveau de la zone bordante d'une zone infarctée, les cellules Abcg2⁺ sont retrouvées en grand nombre. Hierlihy et collaborateurs ont montré également que des cellules SP pouvaient se différencier *in vitro* mais l'observation de fusions cellulaires soulevait la question du réel potentiel cardiogénique de ces cellules (Hierlihy, Seale et al. 2002).

En 2003, Beltrami et collaborateurs ont été les premiers à décrire une population c-kit⁺ issue de cœurs adultes de souris. Ils ont montré que les cellules pouvaient donner des cardiomyocytes qui, une fois injectés *in vivo*, pouvaient remplacer une partie du myocarde infarcté tout en apportant une restauration fonctionnelle. Et ce, sans événements de fusion cellulaire (Beltrami, Barlucchi et al. 2003). Par la suite, ils ont isolé des cellules c-kit⁺ à partir de cœurs humains (Bearzi, Rota et al. 2007). Ils ont montré que les cellules pouvaient s'auto-renouveler, étaient clonogéniques et multipotentes. Les auteurs ont aussi observé une restauration fonctionnelle *in vivo* dans les cœurs infarctés de souris mais sans détecter un couplage direct entre les cellules hôtes et les cellules greffées (Bearzi, Rota et al. 2007).

Auparavant, Messina et collègues avaient aussi obtenu des cellules c-kit⁺ humaines qui poussaient dans des structures appelées « cardiosphères ». Ces cardiosphères sont capables de différenciation en cardiomyocytes, qui, transplantés dans des cœurs endommagés, en améliorent la fonction. De manière très intéressante, il a été démontré qu'il y avait intégration fonctionnelle à travers l'expression de la Cx43 (Messina, De Angelis et al. 2004; Smith, Barile et al. 2007). Cependant des travaux viennent contredire ces résultats en suggérant qu'il n'y a pas de cellule souche cardiaque résidente et que les cellules observées proviennent en réalité de la moelle. Ces affirmations font suite à la constatation qu'après infarctus du myocarde, le nombre de cellule c-kit⁺ augmente dans le cœur, mais surtout, ce sont des expériences de traçage des cellules qui ont permis de remonter jusqu'à la moelle osseuse (Fazel, Cimini et al. 2006). Les cellules seraient alors recrutées de la moelle après lésion. Ces auteurs, soutenus par d'autres, considèrent les améliorations fonctionnelles comme le résultat d'une angiogenèse activée et d'une stimulation paracrine apportée par les cellules greffées (Fazel, Cimini et al. 2006) et pour revue, Wu, Chien et al. 2008).

En parallèle de ces travaux, d'autres ont été menés pour isoler des cellules Sca1⁺. Ainsi, Oh et collaborateurs ont été les premiers à identifier une population de cellules qui exprimaient des marqueurs de la lignée osseuse, des cellules souches hématopoïétiques et des marqueurs cardiaques précoces (Oh, Bradfute et al. 2003). Les cellules se différencient en cardiomyocytes après traitement à la 5-azacytidine. Après injection dans des cœurs infarcis, il a été cependant observé des événements de fusion cellulaire (Oh, Bradfute et al. 2003). Pour différencier les cellules en cardiomyocytes, Matsuura et collaborateurs ont préféré l'oxytocine à la 5-azacytidine, moins efficace. Cependant, la faible proportion de cardiomyocytes obtenus suggère que pour les cellules Sca1⁺ isolées, la voie cardiaque ne serait pas la voie de différenciation privilégiée (Matsuura, Nagai et al. 2004).

Enfin, plusieurs équipes ont cherché à isoler les cellules souches cardiaques sur la base de l'expression d'Isl1, puisque ce facteur de transcription est impliqué dans le développement cardiaque. Il est considéré comme marqueur moléculaire des progéniteurs cardiaques car son expression s'éteint lorsque les cellules s'engagent plus avant dans la différenciation. Laugwitz et collaborateurs ont pourtant retrouvé des cellules Isl1⁺ dans des myocordes de souris, de rat et d'homme. Ils ont démontré que les cellules pouvaient être cultivées, amplifiées et différenciées en cardiomyocytes. Malheureusement, peu ou pas de cellules co-exprimant Isl1 et c-kit ont été retrouvées dans les cœurs murins ou humains et il n'a pas été possible par des expériences de traçage des cellules Isl1⁺ de mettre en évidence que cette population augmente

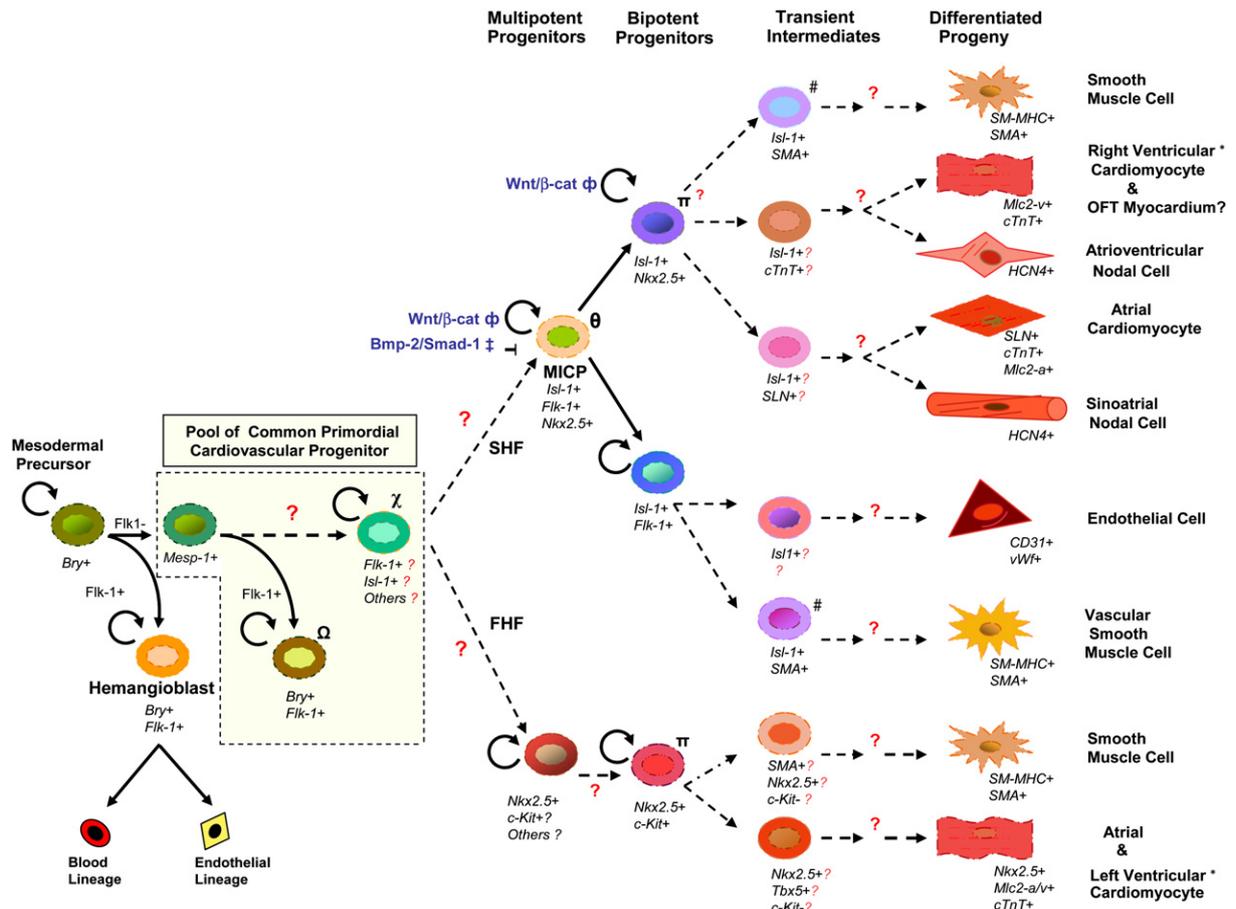


Figure I27: un modèle de la diversification des lignages de cellules cardiaques avec proposition de hiérarchie à partir des progéniteurs pluripotents du mésoderme (d'après Martin-Puig et al. 2008)

Ce schéma prévisoire des devenir des progéniteurs cardiaques repose sur les données disponibles et intègre les travaux réalisés à partir des cellules ES de souris et les résultats de traçage *in vivo*

après infarctus du myocarde, ce qui suggère que ces cellules n'ont pas un rôle déterminant dans la régénération cardiaque endogène (Laugwitz, Moretti et al. 2005).

Les travaux de Ken Chien décrivant la multipotence des cellules Is11⁺ isolées d'embryons murins et dérivées de cellules ES supportent l'idée que ces cellules sont des progéniteurs cardiaques résidents puisqu'ils expriment des gènes cruciaux pour la cardiomyogenèse (Moretti, Caron et al. 2006). De plus, il a été récemment rapporté que des cellules Is11⁺ greffées se différencient en cellules de muscles lisses et cellules endothéliales, participant à l'arborisation coronaire artérielle (Tillmanns, Rota et al. 2008).

La recherche de progéniteurs est aujourd'hui très fournie en travaux sur différents candidats et en combinant les données sur la recherche de progéniteurs endogènes à celles de la recherche de dérivation de progéniteurs à partir de cellules hES, Ken Chien a tenté de hiérarchiser les différents types cellulaires identifiés par leurs marqueurs (**figure I27**) (Martin-Puig, Wang et al. 2008).

Si le dogme du cœur statique au potentiel de réparation limité paraît donc aboli, la population progénitrice reste encore à être isolée et caractérisées. Cela sera rendu possible notamment à travers l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires, et la mise à disposition de nouveaux anticorps (Perino, Yamanaka et al. 2008).

Les essais de thérapie cellulaire cardiaque

Les différents essais sont récapitulés dans le **tableau IT4** (Mazhari and Hare 2007).

La première idée a été de greffer des cellules musculaires dans le muscle cardiaque, en dépit des natures différentes des muscles. L'enthousiasme généré par les résultats encourageants de restauration fonctionnelle à court terme est retombé avec l'apparition de phénomènes de tachycardie. Aujourd'hui, la greffe de cellules myoblastiques s'accompagne de la pose d'un défibrillateur. Partir d'autres sources cellulaires, présentant un potentiel pluripotent plus étendu ou d'origine cardiaque, semble donc plus raisonnable.

Plus largement utilisées, les cellules souches hématopoïétiques ont également fait l'objet d'essais cliniques : BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) et REPAIR-AMI (Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction). Dans l'essai BOOST, qui est le premier essai contrôlé et randomisé (Bartunek, Vanderheyden et al. 2005), soixante patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde ont reçu soit une injection intracoronaire de cellules médullaires autologues non fractionnées après infarctus, soit un traitement médical associé à cette

pathologie. Une augmentation significative de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) a été observée six mois après infarctus dans le groupe traité comparé au groupe contrôle. Cependant, la différence entre l'amélioration de la FEVG entre les deux groupes n'était plus significative à dix-huit mois (Wollert, Meyer et al. 2004). Ces résultats ont suggéré que le bénéfice fonctionnel de la transplantation de cellules médullaires dans le post-infarctus précoce est de courte durée. Finalement, l'essai multicentrique REPAIR-AMI (Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction), contrôlé en double aveugle, a inclus 204 patients, dont la moitié a reçu une injection intracoronaire de cellules médullaires mononucléaires et l'autre moitié une solution placebo trois à sept jours après infarctus (Schachinger, Erbs et al. 2006; Schachinger, Erbs et al. 2006). L'amélioration de la FEVG à quatre mois a été supérieure dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle. Les patients avec une mauvaise FEVG au début du traitement ont davantage profité de la thérapie cellulaire. Un avantage clinique en faveur de la thérapie cellulaire a été reporté (Schachinger, Erbs et al. 2006). L'incidence cumulée d'événements prédéterminés incluant la mort, l'infarctus du myocarde, et la nécessité de revascularisation à douze mois a été inférieure dans le groupe de la thérapie cellulaire comparé au groupe placebo.

Les mécanismes sous-jacents aux résultats positifs sur la fonctionnalité des greffes reportées dans le tableau peuvent être dus soit à une différenciation en cardiomyocytes, même si la controverse subsiste sur cet aspect, soit à un effet paracrine apporté par les cellules greffées. Cet effet paracrine reste la principale cause et se manifeste par une sécrétion de facteurs angiogéniques et/ou antiapoptotiques ou de cytokines ou hormones qui recrutent les cellules de la moelle. La découverte récente de cellules souches cardiaques laisse supposer que certaines cellules greffées vont activer ces cellules souches endogènes et ainsi induire des mécanismes de réparation (Liao, Pfister et al. 2007).

Les effets paracrines ou de fusion cellulaire observés lors des essais de thérapie cellulaire cardiaque permettent une restauration fonctionnelle dans le temps observé dans les différentes expériences (**tableau IT4**). Cependant, le but de la thérapie régénérative est de remplacer les cellules perdues par l'atteinte pathologique. Dans cette optique, les cellules ES peuvent apporter une vraie solution car elles ont montré leur potentiel à se différencier en cardiomyocytes *in vitro* (Kehat, Kenyagin-Karsenti et al. 2001).

Tableau IT5 : Les différents essais de transplantation de cellules issues des hES pour la thérapie cellulaire cardiaque

Laflamme et al. 2005	rat mâle nude	5-10 millions de cardiomyocytes dérivés de cellules hES enrichis au gradient de Percoll dans la paroi du ventricule gauche	les cellules greffées expriment des marqueurs cardiaques spécifiques angiogenèse spécifique du rat et humaine prolifération des cellules greffées pas de détection de la connexine 43
Tomescot et al. 2007	Rats dont les cœurs présentent un infarctus	Injection de cellules hES engagées par un traitement de 48h en présence de BMP2 et d'un inhibiteur au récepteur du FGF2 dans la zone infarctie	2 mois après implantation, les cellules greffées expriment des marqueurs cardiaques spécifiques Aucune formation de tératome
Leor et al. 2007	cœur de rat ischémié, 7 à 10 jours après ischémie	cardiomyocytes battants	îlots de cellules cardiaques isolées du myocarde hôte restauration fonctionnelle (diminution du dérèglement de la systole du ventricule gauche, et réduction de l'aminçissement du mur ventriculaire) pas de formation de nouveau myocarde 1 cas de tératome sur 7
Dai et al. 2007	cœur ischémié de rat nude. Injection après ischémie	Corps embryoïdes cultivés 12 jours dans milieu conditionné END2 injection de 2 millions de cellules dans un site d'injection.	différents niveaux d'organisation sarcomérique des cellules greffées à 1 semaine après transplantation A 4 semaines, juxtaposition de cellules greffées/cellules de l'hôte avec rares contacts via Connexine 43
Laflamme et al. 2007	cœurs ischémiés de rats nudes injection 4 jours après ischémie	5 millions de cardiomyocytes dérivés de cellules hES cultivées sur Matrigel en présence de BMP4 et Activine A, enrichissement au gradient de Percoll. Injection en présence de cocktail de facteurs de survie	4 semaines après greffe: zone infarctie remuscularisée îlots de cellules avec juxtaposition cellules greffées/cellules hôtes, partage de jonctions communicantes organisation sarcomérique immature atténuation de la progression de l'atteinte cardiaque (dilatation ventriculaire réduite, amélioration du raccourcissement fractionnel et de la fraction d'éjection, amélioration du mouvement du mur)
Caspi et al. 2007	cœurs ischémiés de rats Sprague Dawley immunosupprimés injection 7 à 10 jours après ischémie	1-5 millions de cardiomyocytes disséqués de corps embryoïdes battants	1 à 2 mois après greffe dans cœur ischémié, 25% de la zone lésée composée de myocarde dont 45% des cellules sont humaines diminution du remodelage du cœur, de la dilatation du ventricule gauche et de la détérioration fonctionnelle A 2 mois, meilleur raccourcissement fractionnel, aminçissement du mur amoindri, diminution de la dilatation ventriculaire prolifération observée des cardiomyocytes, pas de formation de tératome
van Laake et al. 2007	cœurs de souris sains et ischémiés	1 million de cellules contenant 20-25% de cardiomyocytes après co-culture sur END-2	A l'IRM, la fonction cardiaque est améliorée 4 semaines après greffe dans des cœurs ischémiés mais pas à 12 mois, même si les cellules greffées sont toujours présentes
van Laake et al. 2008	cœurs de souris sains et ischémiés	3 millions de cellules contenant 20-25% de cardiomyocytes après co-culture sur END-2 dans 3 sites différents	taille du greffon augmente, la fonction cardiaque est préservée à 4 semaines après infarctus mais pas à 12 semaines (identique au contrôle)

2.3. Utilisation des cellules souches embryonnaires pour la thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque

La découverte des cellules souches embryonnaires et les travaux montrant que les cardiomyocytes peuvent être obtenus à partir de cellules ES ont évidemment suscité un intérêt particulier pour ces cellules.

Les premiers travaux réalisés avec les cellules embryonnaires de souris ont apporté une preuve du concept : les greffes prennent, l'amélioration fonctionnelle est réelle s'accompagnant d'une différenciation sans équivoque des cellules greffées, de leur couplage électrique avec les cellules hôtes, ainsi que d'un couplage avec les vaisseaux et les cellules endothéliales (pour revue, Christoforou and Gearhart 2007).

Les travaux réalisés à partir de cellules souches embryonnaires humaines peuvent être résumés dans le **tableau IT5**.

Les cellules cardiaques dérivées des cellules hES se montrent donc capables de se comporter, au niveau de la structure et de la fonction, comme des cardiomyocytes précoces et qui peuvent s'intégrer *in vivo* en observant un couplage avec les cellules du myocarde hôte, dans les modèles animaux.

Récemment, un suivi des cellules transplantées a été réalisé sur 12 mois pour étudier les effets de la transplantation de cellules hES chez des souris (van Laake et al. 2007, *Stem. Cell. Res.*, **Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction** nouvelle revue non recensée dans PubMed). Une solution contenant 20-25% de cardiomyocytes dérivés de cellules hES a été injecté dans des souris NOD-SCID. Ces travaux montrent que la restauration fonctionnelle est équivalente chez les souris ayant reçu des cardiomyocytes et celles qui ont reçu des cellules non-cardiomyocytes, c'est-à-dire les 75-80% des cellules dérivées des cellules hES. Les deux populations présentent des résultats fonctionnels meilleurs que les souris n'ayant reçu aucune cellule. Le résultat important de cette étude est que les cellules survivent et deviennent matures au cours de ces 12 mois. Il apparaît que les cellules hES permettent une régénération fonctionnelle à moyen terme mais pas à long terme, en raison de l'intégration très partielle à l'organe hôte et du manque de structure des cellules cardiaques greffées (van Laake, Passier et al. 2008).

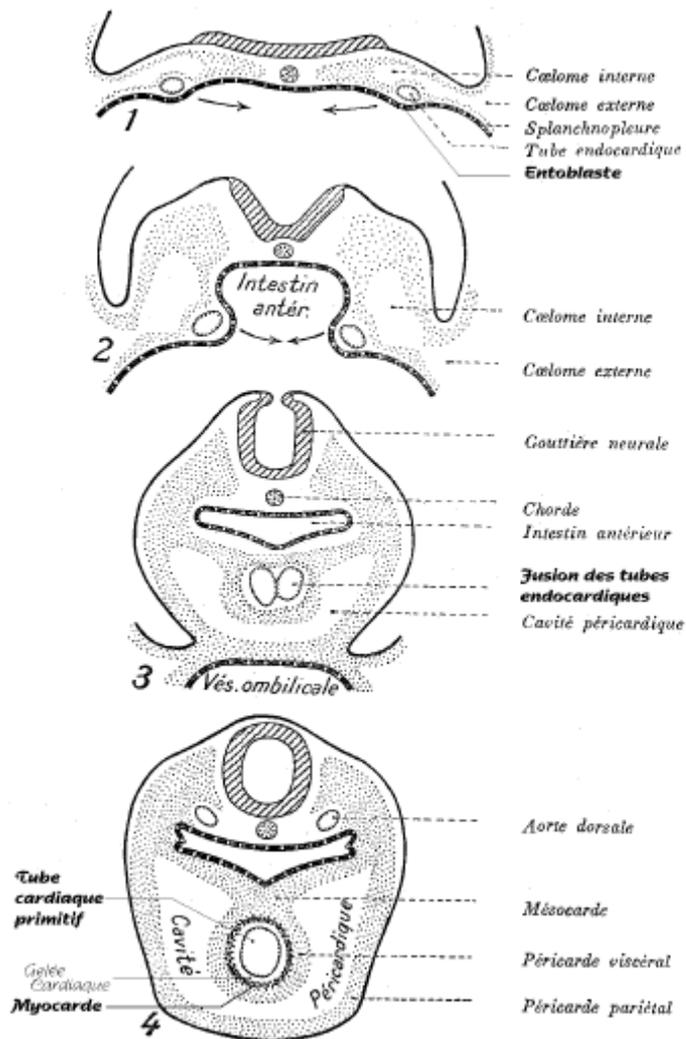


Figure I28 : Formation du tube cardiaque primitif.

Le mésoderme cardiaque se met en place lors de la gastrulation. Les mouvements de délimitation conduisent à la fusion ventrale des deux ébauches cardiaques.

Les imperfections constatées à la suite de ces essais ont motivés les investigateurs à prendre en compte les connaissances sur le processus de la cardiomyogenèse pour déterminer des facteurs permettant d'améliorer les protocoles de différenciation.

2.3.1 Connaissances sur le développement embryonnaire du cœur

Les recherches en thérapie cellulaire appliquées aux maladies cardiaques sont nourries puisque les problèmes cardiovasculaires constituent un des principaux fléaux dans le monde industrialisé. De ce fait, les données sont nombreuses quant à la biologie du développement du cœur, les essais de différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules cardiaques, ainsi que les essais de greffe qui ont été entrepris.

Morphogenèse cardiaque

Le cœur est formé à partir du mésoderme, feuillet intermédiaire de l'embryon qui donne naissance à tout ou partie des organes internes à l'exception du système nerveux et des organes du système digestif. Le cœur est le premier organe fonctionnel de l'embryon développé après la gastrulation. Les premiers battements sont détectés dès la 3^{ème} semaine.

Avant la gastrulation, les progéniteurs cardiaques sont localisés dans le feuillet ectodermique primitif. Avec la gastrulation, apparaît le troisième feuillet embryonnaire, le mésoderme.

Le cœur résulte de la fusion de deux tubes latéraux situés de part et d'autre de l'entoblaste antérieur (**figure I28, 1**): les tubes endocardiques. Les tubes endocardiques se forment à la fin de la 3^{ème} semaine au sein du mésoblaste crânial, dans une zone très proche du bord du disque embryonnaire, en avant de la plaque neurale et de la membrane pharyngée (**figure I28, 2**). Rapidement, les mécanismes de courbure (courbure céphalique associée à la courbure globale du corps de l'embryon et à la migration du septum transversum) amènent les tubes endocardiques en position thoracique (**figure I28, 3**). Ils fusionnent alors par apoptose pour former le tube cardiaque primitif (**figure I28, 4**). Ce déplacement a amené le tube cardiaque en avant des aortes dorsales droite et gauche. Il est entouré par du mésoblaste splanchnopleural qui fournira plus tardivement le feuillet viscéral du péricarde mais aussi la couche musculaire, ou myocarde. Le tube cardiaque primitif se creuse de sillons transversaux qui permettent d'identifier plusieurs zones. D'avant en arrière : le bulbe du cœur, le ventricule primitif, l'oreillette primitive, et le sinus veineux. Des inflexions du tube se produisent au niveau des sillons. Le tube cardiaque primitif prend alors la forme d'un "S" puis d'un "U". Ces inflexions résultent de processus actifs, avec une plus forte prolifération, génétiquement

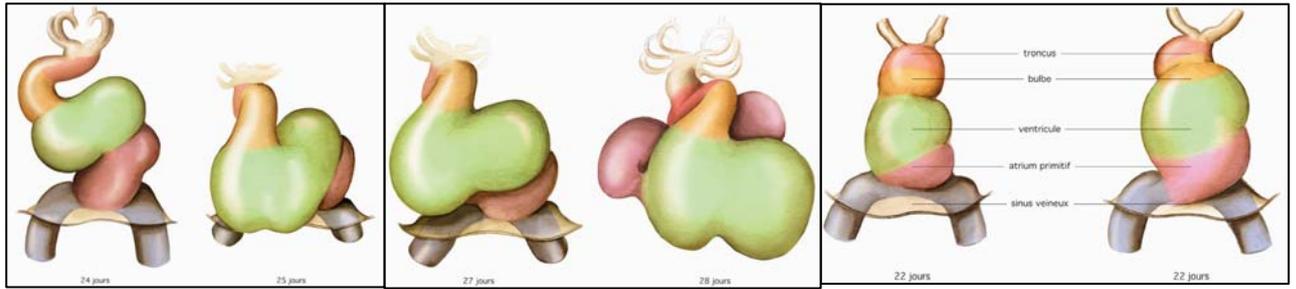


Figure I29 :Piure du tube cardiaque

La croissance du tube conduit à des mouvements de repli. Le tube se déforme d'abord en S puis subit une rotation selon l'axe céphalo-caudal. Il en résulte que le pôle veineux cardiaque occupe une position dorsale alors que le pôle artério-ventriculaire se place au niveau ventral

Cœur en remodelage

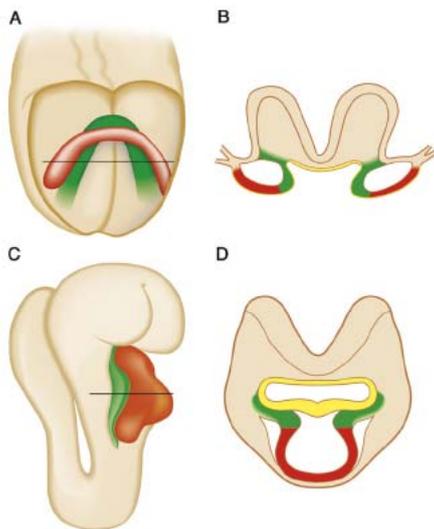
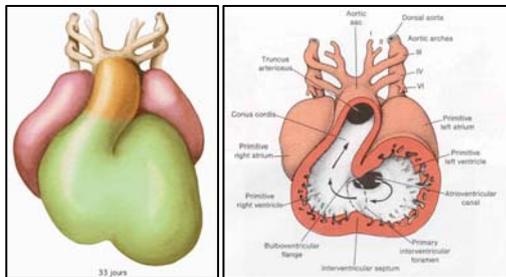


Figure I30. Les champs cardiaques primaire et secondaire contribuent à la formation du cœur mammifère (d'après Dunwoodie 2007)

(A) Vue ventrale du stade du croissant cardiaque chez la souris met qui en forme le champ cardiaque primaire (rouge) apposé au champ cardiaque secondaire, localisé plus dorsalement (vert). (B) Une section au niveau indiqué en (A) montre que les champs cardiaques primaire et secondaire sont adjacents et que le champ cardiaque secondaire est associé à l'endoderme de l'intestin primitif (jaune). (C) La vue ventro-latérale du stade du tube cardiaque linéaire illustre que le tube cardiaque primaire (rouge) est dérivé du champ cardiaque primaire de (A), avec le champ cardiaque secondaire positionné dorsalement. (D) La section indiquée en (C) montre que le champ cardiaque secondaire est contigu avec le tube cardiaque primitif (rouge) et l'endoderme pharyngé (jaune).

programmée, de la paroi droite du ventricule et de la paroi gauche de l'oreillette. Il ne s'agit donc pas d'un simple repliement du tube cardiaque sous la contrainte de l'étroitesse de l'environnement thoracique.

Pendant la torsion, un important remodelage des structures internes se met en place, s'accompagnant d'une séparation et connectivité des différentes cavités ainsi que de la finalisation des septums et de l'achèvement de la genèse des valves (**figure I29, cœur en remodelage**). Une cavité cardiaque correspond à une forme spécialisée du muscle qui est le produit d'une induction, par opposition à un état par défaut. L'induction des chambres prendrait naissance dans une région du tube cardiaque qui ne participe pas à la constitution des cavités.

Les expériences d'ablation tissulaires et génétiques, de marquage des lignages dans les embryons de poulet et de souris ont permis de mettre en évidence l'existence de deux champs cardiaques (Buckingham, Meilhac et al. 2005) (**figure I30**). Les deux champs présentent des populations de progéniteurs différentes ou des dérivés différents du progéniteur commun (Abu-Issa, Waldo et al. 2004). Les expériences de marquage montrent que certains transgènes ne sont exprimés que dans un champ et ses dérivés mais aussi que certaines régions du cœur semblent être formées à partir des deux champs. Récemment, un troisième champ a été proposé pour comporter des précurseurs myocardiques qui forment les « cornes » définitives du sinus veineux. Ces précurseurs n'expriment pas les marqueurs du champ cardiaque secondaire et expriment uniquement Tbx18 (Christoffels, Mommersteeg et al. 2006). Ces données suggèrent que ces cellules sont devenues myogéniques à travers une voie différente de celles des autres myocytes présents dans le tube cardiaque.

Les acteurs de la cardiogenèse.

Le destin cardiaque des progéniteurs présents aux différents stades du développement cardiaque est le résultat de l'intégration de signaux régulateurs positifs et négatifs qui proviennent des tissus avoisinants aussi bien que de manière interne. Des interactions inductrices entre l'endocarde et le myocarde d'une part, et entre l'épicarde et le myocarde d'autre part sont essentielles pour la croissance et le développement corrects des chambres de l'organe.

Parmi les acteurs identifiés dans la morphogenèse du cœur, on peut distinguer les inducteurs des effecteurs impliqués dans les voies induites par les premiers. Parmi les inducteurs, on trouve Hedgehog, les BMPs, les FGFs, les Wnts et leurs antagonistes, on peut citer comme

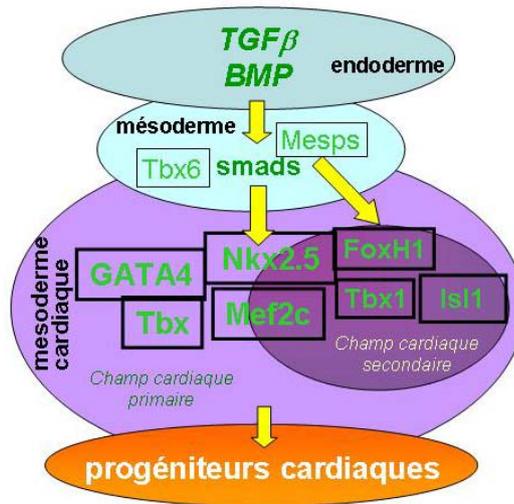


Figure I31 : Réseaux transcriptionnels déterminant le phénotype cardiaque *in vitro* et *in vivo* D'après Pucéat, 2005

Les progéniteurs cardiaques de l'épiblaste rejoignent, au cours de la gastrulation, le mésoderme en migrant à travers la ligne primitive. Les cellules alors compétentes se trouvent en contact avec l'endoderme sécrétant les facteurs de la superfamille du TGFβ (TGFβ, BMP2). Ces facteurs activent l'expression de facteurs de transcription. Ces derniers, agissant en combinaison les uns avec les autres, permettent la spécification du mésoderme cardiaque, puis des lignages cardiaques primaire et secondaire. Les cellules du champ primaire donneront naissance aux oreillettes et au ventricule gauche, et celles du champ secondaire au ventricule droit et au tronc artériel.

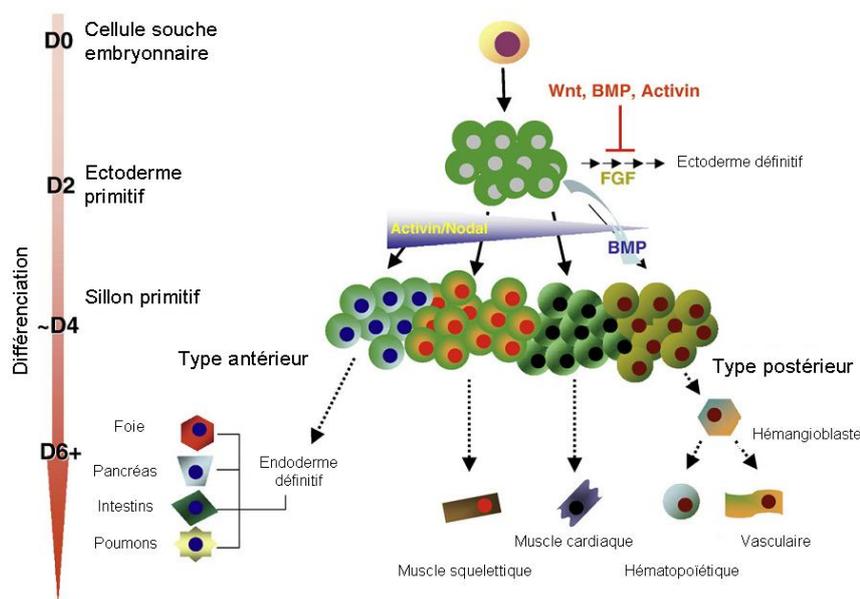


Figure I32 : Schéma possible de différenciation des cellules ES et des facteurs spécifiques dans la formation des feuilletts primitifs (d'après Perino *et al.* 2008)

Un sillón primitif hypothétique consistant de populations à la fois de type antérieur et postérieur est représenté, dont les populations sont basées sur les données chez la souris. Il a été montré que le FGF joue un rôle dans l'induction neurale alors que Wnt, BMP et l'activin sont plutôt impliqués en tant qu'inhibiteurs des premières étapes de cette voie. BMP4 induit le mésoderme postérieur, tandis qu'un gradient d'Activin/Nodal est nécessaire pour d'autres décisions d'engagement de lignage. A de faibles concentrations d'Activin, les populations générées sont plutôt de type antérieur alors qu'à de fortes concentrations, cela induit la formation de l'endoderme, correspondant à une population dérivée du sillón primitif antérieur.

effecteurs Nkx2.5, GATA4, Isl1, MEF-2C, Tbx5, SRF et Foxh1. Il en existe beaucoup d'autres mais ceux-ci sont les plus souvent cités et sont représentés dans la **figure I31**.

L'induction cardiaque est initiée par l'endoderme viscéral antérieur (Arai, Yamamoto et al. 1997). La signalisation implique Hedgehog, les BMPs, les FGFs, la voie non canonique Wnt-JNK (c-Jun-N-terminal Kinase) en ce qui concerne les influences positives. Les événements d'induction et le devenir des cellules du sillon cardiaque primitif sont schématisés dans la **Figure I32**. Ces facteurs sont exprimés de manière variable dans le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Pour les influences négatives, c'est la voie canonique Wnt/ β -caténine qui est sollicitée. Cependant, de récentes études sur le développement du cœur élaborées dans le système des cellules souches embryonnaires ont montré que cette voie canonique est en réalité requise dans des étapes précoces de différenciation (Nakamura, Sano et al. 2003).

Pendant les étapes précoces et tardives du déploiement du champ cardiaque secondaire, on retrouve une expression des BMPs, FGFs, Sonic Hedgehog, Wnts et leurs agonistes dans et autour de ce champ. Plus que les facteurs de croissance, les facteurs de transcription vont jouer un rôle pivot dans les fonctions des deux champs cardiaques. Certains ne sont exprimés que dans un des champs et d'autres dans les deux.

Nkx2.5 est exprimé dans les deux. C'est le facteur de transcription impliqué dans le développement cardiaque. Son expression est activée par les BMP et les voies de signalisation mises en jeu impliquent les protéines Smad et GATA. L'initiation de l'expression de Nkx2.5 apparaît au moment du repli de la tête dans les progéniteurs cardiaques. En même temps, les cellules de l'endoderme adjacent de l'intestin primitif antérieur se mettent aussi à exprimer Nkx2.5. Celui-ci est toujours présent dans le tube cardiaque, puis dans les deux champs cardiaques et son expression persiste jusqu'à l'étape de vrillage du tube cardiaque. MEF2C est lui aussi exprimé dans les deux champs depuis le stade du repli de l'embryon jusque dans ses dérivés, tout comme Tbx5, dont l'expression débute au même stade précoce, et dont profil d'expression apparaît ensuite suivre un gradient le long du tube cardiaque avec une expression plus forte dans la région sinuatriale. Ce gradient résulte de l'induction par l'acide rétinoïque.

Isl1 apparaît comme le facteur qui a mis en évidence l'existence du champ cardiaque secondaire. Il est aussi exprimé dans l'endoderme, dans l'intestin primitif antérieur, au début de l'induction cardiaque. Son expression s'éteint à mesure que les cellules du champ secondaire entrent dans la formation du tube cardiaque. Les gènes *Tbx*, *fgf8* et *Foxh1* ont aussi été identifiés comme gènes exprimés dans le champ cardiaque secondaire.

Les signaux de signalisation du développement cardiaque sont également requis pendant plusieurs étapes de la morphogenèse du cœur. De manière spécifique aux étapes et aux tissus, les signaux environnants sont perçus et intégrés et la réponse cellulaire qui en découle fait intervenir l'expression de gènes que l'on peut qualifier de « sélecteurs ». Ces gènes « sélecteurs » gouvernent le devenir de groupes de cellules et régulent des réseaux complexes de gènes. Nkx2.5 peut être considéré comme un de ces gènes puisqu'il joue un rôle à différentes phases au cours du développement du cœur : dans les étapes précoces comme l'induction tissulaire et dans les étapes plus tardives qui incluent la différenciation terminale et la maturation des champs (Pashmforoush, Lu et al. 2004).

La mise en évidence de progéniteurs communs

Le modèle des cellules ES a représenté un instrument pour l'indentification et la caractérisation des populations de cellules qui représentent les stades précoces du développement et de l'engagement dans les différents lignages, stades difficiles d'accès chez l'embryon (Kattman, Adler et al. 2007). Dans le système hématopoïétique, les cellules ES en différenciation ont été utilisées pour identifier l'hémangioblaste, un progéniteur qui représente l'étape la plus précoce dans l'engagement hématopoïétique (Choi, Kennedy et al. 1998; Nishikawa, Nishikawa et al. 1998). Initialement, cet hémangioblaste a été identifié comme un progéniteur exprimant Flk1 et un marqueur du mésoderme précoce, Brachury,.

Flk1 (Fœtal liver kinase 1) et ou VEGFR-2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) ou encore le récepteur pour le VEGF ou le VEGFC et possède une activité tyrosine kinase. Son homologue humain est le KDR (Kinase insert Domain Receptor). Ainsi, il est le premier acteur dans la signalisation induite par le VEGF qui est impliquée dans le développement vasculaire et dans la régulation de la perméabilité vasculaire.

Récemment, Kennedy et collaborateur ont identifié et caractérisé l'hémangioblaste humain obtenu à partir de cellules hES (Kennedy, D'Souza et al. 2007). L'identification de cet hémangioblaste humain, basée sur les observations faites chez la souris indique que d'importants aspects d'engagement dans les lignages sont conservés entre les deux espèces, ce qui laisse envisager que d'autres découvertes, telles que celle des progéniteurs cardiaques, sont transposables au système des cellules hES (Kattman, Adler et al. 2007).

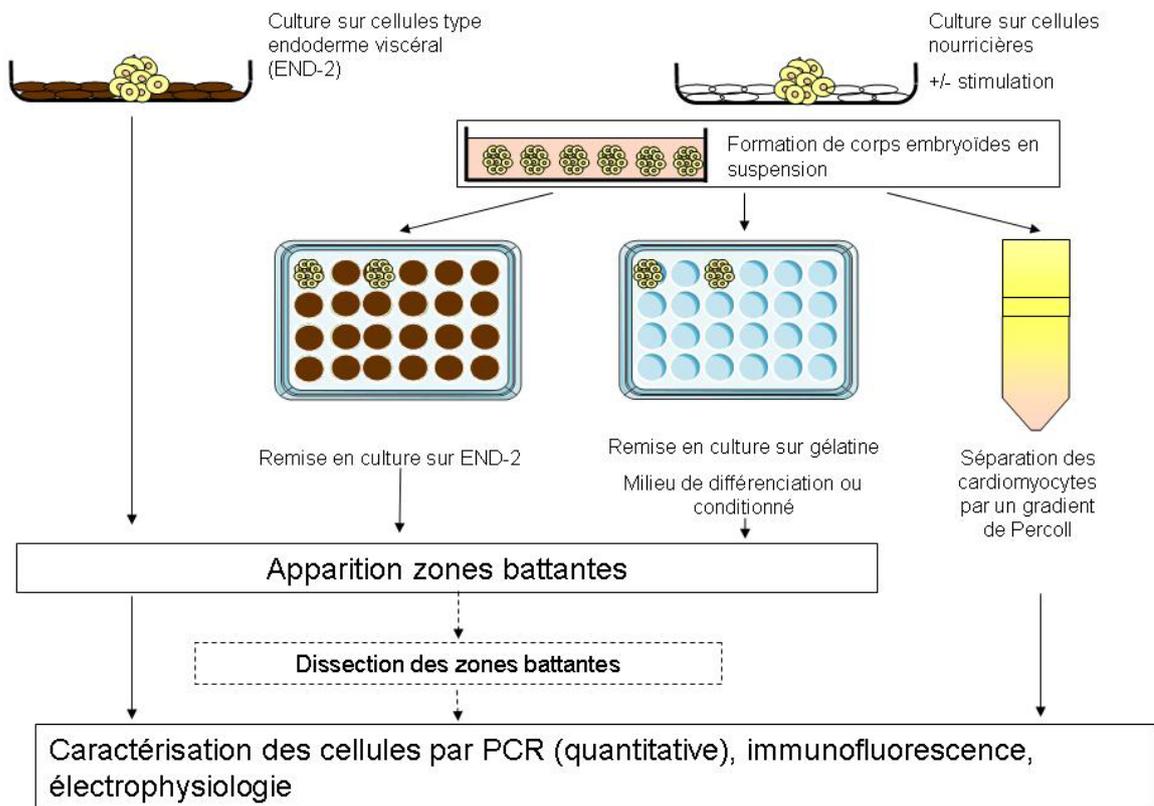


Figure I33 : schéma récapitulatif des différents protocoles de différenciation cardiaque.

Les cellules hES sont soit mises en suspension pour former des corps embryoides, soit co-cultivées en présence de cellules de type endoderme viscéral (cellules END-2). Une stimulation par un facteur de croissance peut être mise en place auparavant. Les corps embryoides sont ensuite soit réensemencés sur les cellules END-2, soit sur gélatine ou encore passés sur un gradient de Percoll permettant de collecter les cardiomyocytes dans une fraction. A cette fin, les zones battantes apparaissant dans les cellules issues ou non de corps embryoides cultivées sur END-2, ou dans les cellules issues des corps embryoides peuvent être disséquées.

Les cellules issues de ces différentes approches sont étudiées pour leur potentiel cardiaque en étudiant les gènes cardiaques exprimés par analyse de biologie moléculaire ou par immunofluorescence, mais aussi en étudiant leurs caractéristiques électrophysiologiques.

2.3.2 Les protocoles de différenciation guidée

Dès que des lignées de cellules souches embryonnaires ont été disponibles, les chercheurs ont rapidement mis en pratique les connaissances acquises sur l'étude du développement embryonnaire du cœur et complété les recherches en développement. Les différentes approches peuvent être résumées dans le **tableau IT6** (d'après Heng, Haider et al. 2004). Ainsi, c'est en 2001 que les premiers cardiomyocytes ont été obtenus à partir de cellules hES par Kofidis et collaborateurs. Des zones battantes caractérisent visuellement la présence de cardiomyocytes. (Kehat, Kenyagin-Karsenti et al. 2001). Malheureusement, le rendement assez faible - 8 à 10% des structures observées au microscope présentent des zones battantes de manière synchrone - et la délicate dissection des zones battantes pour isoler les cellules d'intérêt rend ce protocole insatisfaisant (**figure I33**). Xu et collaborateurs ont alors imaginé isoler les cellules battantes par une séparation au travers d'un gradient au Percoll (Xu, Police et al. 2002) (**figure I33**). D'autres ont misé sur une technique de co-culture pour s'affranchir de la formation de corps embryoïdes trop hétérogènes pour permettre un bon rendement en cellules d'intérêt. Le groupe de Christine Mummery utilise donc des cellules type de l'endoderme viscéral, pour reproduire la signalisation observée dans l'embryon des cellules de l'endoderme vers les cellules du mésoderme et ainsi induire la différenciation cardiaque (Mummery, Ward et al. 2002) (**figure I33**). Récemment, les travaux de Michel Pucéat ont montré que lorsque des cellules souches embryonnaires murines étaient cultivées en présence de BMP2 et de TGB- β , le potentiel de différenciation cardiaque était augmenté avec plus de zones battantes et une meilleure myofibrogenèse (Behfar, Zingman et al. 2002). Plus récemment, ces résultats ont été reproduits à partir de cellules souches embryonnaires humaines (Tomescot, Leschik et al. 2007; Leschik, Stefanovic et al. 2008) (**figure I33**).

De nombreux facteurs sont envisagés par différents scientifiques pour initier ou améliorer la différenciation cardiaque. Certains facteurs comme les radicaux libres et espèces actives de l'oxygène sont connues pour avoir un effet positif sur la différenciation cardiaque (Sauer, Wartenberg et al. 2001), mais sans que l'on connaisse exactement leur rôle. De ce fait, peu de protocoles les incluent. Le rôle de la matrice extracellulaire étant très important, certaines approches misent donc sur la reproduction des interactions avec la matrice extracellulaire que les cardiomyocytes trouvent *in situ* en utilisant des protéines telles que la fibronectine ou le collagène. Les mécanismes ne sont pas encore bien connus et peu d'études rapportent un protocole de différenciation optimisé en développant cet aspect. Les différentes approches sont résumées dans le **tableau IT6** (d'après Heng, Haider et al. 2004) qui rapporte aussi les

Tableau IT6 : Protocoles de d'obtention de cardiomyocytes. D'après (Heng et al. 2004)

stratégie	avantages	inconvénients	
<p>Protocole classique : formation corps embryoïdes, ensemencement sur gélatine en présence de sérum (Kehat et al. 2001)</p> <p>Dissection des zones battantes</p> <p>Séparation sur gradient de Percoll</p> <p>Milieu de culture</p> <p>Ajout de facteurs cardiogéniques (BMP2) (Behfar et al. 2002 ; Sachinidis et al. 2003) pour engager les cellules dans la voie de différenciation cardiaque</p>	<p>Ca marche, pas de difficulté de protocole</p> <p>Population très enrichie en cardiomyocytes fonctionnels idem</p> <p>Population moins hétérogène que celle des corps embryoïdes</p> <p>Nombre de cellules au départ moins important</p>	<p>Faible rendement, une population hétérogène,</p> <p>Manipulation délicate</p> <p>idem</p> <p>Coût, processus réversible : les cellules doivent être greffées pour poursuivre leur différenciation</p> <p>Pas de maîtrise des facteurs : quand les appliquer, à quelle concentration, quelle durée, en combinaison avec quel(s) autres(s)facteur(s)...</p>	
Matrice extracellulaire	Collagène, fibronectine, élastine, laminine, Tenascine C (Imanaka-Yoshida et al. 2003), acide hyaluronique {Kalman et al. 1995 ; Wheatley et al. 1995)	Amélioration de la différenciation	Mécanismes d'action peu connus.
Co-culture	END-2 {Mummery et al. 2002 ; Mummery et al. 2003), culture primaire de cardiomyocytes fœtaux (Condorelli et al. 2001)	Contacts cellulaires cruciaux pour induction de la différenciation	Ne reproduit pas la situation pathologique Risque de transmission de pathogènes Difficulté à séparer les populations Application clinique inenvisageable tant que les cellules utilisées sont d'origine animale.
Milieu conditionné	Milieu de culture des END-2 ou culture primaire de cardiomyocytes	Evite la contamination par des populations de cellules animales	Moins efficace que la coculture. Contient des éléments d'origine animale
Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène	Application exogène de NO, radicaux libres...(Sauer et al. 2001)	Reproduit la situation pathologique	Recherches sur leur rôle sont peu fournies, on ne sait pas comment les utiliser
Stimulus physique	<p>Application d'un <u>pulse électrique</u> (Sauer et al. 2000)</p> <p><u>Stimulus mécanique</u> : culture en bioréacteur (Akins et al. 1997)</p> <p><u>Choc thermique</u> : avant transplantation (Zhang et al. 2001)</p>	<p>favorise l'induction de la différenciation à l'intérieur des corps embryoïdes</p> <p>Reproduit les conditions de microgravité</p>	<p>Difficile à mettre en place</p> <p>Nécessité de maîtriser le domaine des bioréacteurs</p> <p>On ne sait pas ce que ça fait</p>
Utilisation lignées transgéniques	Gène rapporteur (GFP) sous contrôle de promoteur de gènes impliqués dans la différenciation, non membranaires	Possibilité de tri population engagée, meilleur rendement	La population triée peut contenir plusieurs types cellulaires application en clinique

inconvénients de chaque méthode abordée. Il ressort de ces données qu'aucune approche en particulier ne permet d'obtenir des cellules pour une application clinique : soit le protocole est inapplicable (co-culture avec des cellules animales, utilisation de sérum dans le milieu), soit la population cellulaire est mise en cause (pureté de la population, modification génétique). Au début de ma thèse, aucun consensus n'était en vigueur sur la méthode pour obtenir des cardiomyocytes avec un rendement raisonnable dans une optique de greffe, et les efforts de recherche d'un protocole de différenciation optimal étaient soutenus.

Certaines limites de ces protocoles sont liées à l'application en thérapie cellulaire, notamment en matière de protocoles de microdissection ou d'enrichissement au Percoll. A cause du faible rendement du protocole de différenciation et des pertes dues à ces techniques délicates, il faut prévoir un très grand nombre de cellules au départ, pour pouvoir assurer la greffe d'un nombre suffisant de cellules. En effet, 5 à 10 millions de cellules enrichies au gradient de Percoll ont été injectées dans des ventricules de rats (Laflamme, Gold et al. 2005), sachant que l'enrichissement permet d'obtenir 15% de cardiomyocytes, le nombre de cellules au départ est trop élevé pour imaginer utiliser cette méthode en clinique, sans compter le fait que les populations cellulaires obtenues après centrifugation du Percoll ne sont pas pures, avec un risque de conserver des cellules encore indifférenciées.

Pour caractériser les cellules différenciées, les données du développement cardiaque nous permettent de déterminer les molécules à identifier.

Par des techniques de biologie moléculaire, on traque les facteurs de transcription exprimés aux différentes étapes de la cardiogenèse. Ce sont ceux qui ont été évoqués comme acteurs de cette cardiogenèse, à savoir Nkx2.5, Gata4, Isl1, Mef2C SRF et Tbx. Les éléments de structure des cardiomyocytes sont aussi analysés. A partir d'une dizaine de jours de différenciation, nous recherchons donc l'expression de l' α -actine cardiaque, la troponine cardiaque, les chaînes légères de myosines atriale et ventriculaire ou encore le peptide atrial natriurétique (ANP). Ces protéines de structure sont aussi repérées par des techniques d'immunofluorescence. En effet, par les techniques de biologie moléculaire telles que la PCR, on sait que l'ARN messager est exprimé. Or pour que la cellule cardiaque soit fonctionnelle, il faut que le sarcomère soit correctement organisé dans le cytoplasme et puisse réagir aux stimulations électriques. Pour ce dernier aspect, des techniques très sophistiquées permettent de suivre, au niveau cellule cardiomyocytaire isolée, le profil du potentiel d'action et l'influence de différentes drogues (Reppel, Pillekamp et al. 2004).

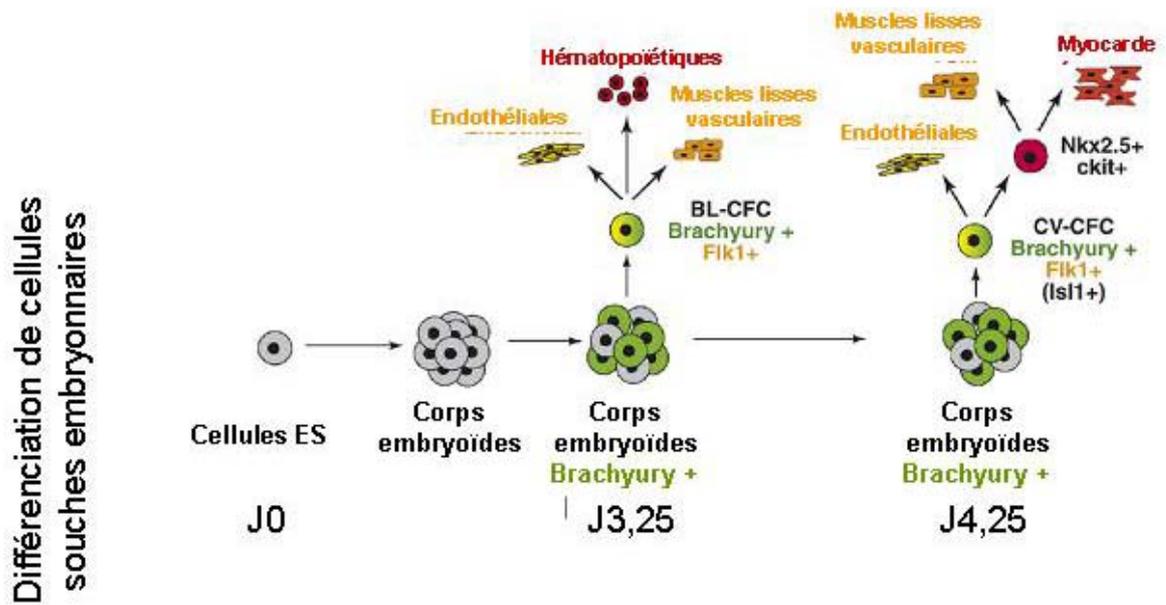


Figure I34 : Différenciation des cellules ES en progéniteurs cardiaques, (d'après Kattman, 2007)

Les cellules ES différenciées en corps embryoides (en gris) expriment Brachyury (en vert). A J 3,25 de différenciation, ces cellules expriment Flk1 (jaune) et s'engagent dans les lignages primitifs hématopoïétique et endothélial. Une population de cellules brachyury+/Flk1- présente à J3,25 génère une seconde population Flk1+ après 24h de culture et contribue au lignage cardiovasculaire.

Protocoles de recherche de progéniteurs cardiaques.

La mise en évidence de progéniteurs communs décrits précédemment suggère que l'on peut obtenir une population transplantable. Certaines études sont menées pour tenter d'obtenir ces cellules, en partant du résultat que Flk1 a été détecté dans les cellules mésodermiques de l'embryon, dans une région amenée à devenir le cœur (Yamaguchi, Dumont et al. 1993). Les cellules hémangioblastes expriment Flk1 (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998) mais aussi Brachury, marqueur du mésoderme précoce (Fehling, Lacaud et al. 2003). Ainsi, dans la recherche de progéniteurs cardiovasculaires, les cellules ES de souris en différenciation ont été triées sur l'expression de Flk1. Les populations de progéniteurs cardiaques ainsi isolées peuvent donner des cardiomyocytes, avec une amélioration du rendement par rapport à celui obtenu par le protocole « classique ». Par ailleurs les différents auteurs ont montré que les populations obtenues pouvaient donner des cellules hématopoïétiques et vasculaires (Iida, Heike et al. 2005; Kouskoff, Lacaud et al. 2005; Yamashita, Takano et al. 2005). Selon les approches, les cellules triées sont soit ré-ensemencées sur OP9 (Yamashita, Takano et al. 2005), soit ré-agrégées (Kouskoff, Lacaud et al. 2005), puis retriées. Les cellules OP9 sont connues pour aider au maintien des cellules souches hématopoïétiques, et à la différenciation des cellules ES dans différents lignages tels que la voie mésodermique, hématopoïétique, endothéliale et récemment il a été montré qu'elles pouvaient induire la différenciation cardiomyocytaire (Iida, Heike et al. 2005; Kouskoff, Lacaud et al. 2005; Yamashita, Takano et al. 2005). Lors du deuxième tri, pour isoler des progéniteurs plus avancés dans la différenciation, certains auteurs ont associé au marquage KDR/Flk1 un marquage contre CXCR4, le récepteur de la chémokine CXCL12, normalement impliqué dans la mobilisation de certaines populations de progéniteurs de la moelle osseuse. Les résultats de Yamashita montrent que les cardiomyocytes dérivés à partir des cellules ES de souris expriment Flk1 (KDR) et CXCR4 (Yamashita, Takano et al. 2005).

La suite des travaux de Kouskoff et collaborateurs a permis d'isoler une population de progéniteurs cardiaques différente de celle isolée en 2005, et de ré-envisager le tri sur des cellules n'exprimant pas Flk1 (Kattman, Huber et al. 2006). En effet, les cellules triées à J3,25 Flk1⁻ ont été ré-agrégées pendant 24 heures puis retriées (**figure I34**). Les cellules Flk1⁺ issues de ce second tri sont capables de donner des cardiomyocytes avec une efficacité de 50%, ainsi que des cellules endothéliales. Les travaux démontrent que cette population est différente de celle Flk1⁺, isolée à J3,25, suggérant ainsi une différenciation séquentielle entre progéniteurs hémangioblastes (Flk1⁺ à J3,25) et progéniteurs cardiovasculaires (Flk1⁻ à J3,25, puis Flk1⁺ après 24h d'agrégation).

La seule expression de Flk1 ne suffit pas, la plupart de ces travaux utilisent des cellules génétiquement modifiées pour exprimer la GFP sous le contrôle du promoteur de *Nkx2.5* ou de *Brachyury*.

L'émergence des travaux exploitant le potentiel des cellules souches embryonnaires permet aujourd'hui, non pas de se placer à l'étape de mise au point d'un protocole pour obtenir des cellules cardiaques, mais déjà de se positionner à l'étape d'optimisation de ce protocole dans une optique de thérapie.

Enfin, la biologie des cellules souches embryonnaires étant encore assez jeune, le passage aux essais de transplantation n'est pas encore systématique, et l'établissement d'un modèle intermédiaire entre le modèle de culture *in vitro* et l'animal entier permettrait de progresser rapidement dans l'étude des cellules *in situ* notamment en ce qui concerne leur survie, leur différenciation, et leur capacité à interagir avec les cellules hôtes.

Certains problèmes restent cependant à être résolus en plus de ceux inhérents aux cellules hES évoqués précédemment et d'autres surviennent lorsque l'on envisage une application de thérapie cellulaire au niveau clinique.

2.3.3 Les limites

Pour passer à la clinique, de nombreux obstacles restent à franchir. Parmi eux, on peut compter le passage aux conditions de Bonnes Pratiques de Fabrication qui nécessitent des efforts d'amélioration des procédés actuellement mis en place considérables (passer à la culture à large échelle, sans composé d'origine animale, définir de manière unanime au niveau international la réglementation, mettre au point les outils de contrôle qualité)

Les essais d'étude à long terme menés par Christine Mummery montrent que les cellules greffées ne s'organisent pas entre elles et avec les cellules hôtes (van Laake *et al. Stem. Cell. Res.*, 2007 revue non référencée dans PubMed). A la place d'injecter une suspension cellulaire, il a été proposé une méthode alternative consistant à utiliser les progrès réalisés dans le domaine du « tissue engineering ». Ceci ouvre une perspective nouvelle dans la façon d'envisager la thérapie régénérative comme un domaine pluridisciplinaire.

2.4 Tissue engineering

Des essais de thérapie cardiaque ont été réalisés avec des produits tissulaires issus de la technologie du domaine de l'ingénierie des tissus.

Ce domaine de biotechnologie tend à appliquer des principes et des méthodes des sciences de la vie et de l'ingénierie pour développer des substrats biologiques dans le but de restaurer, maintenir ou améliorer une fonction tissulaire. Schématiquement, il s'agit d'associer des cellules à des structures de maintien, ou échafaudages, qui vont guider la croissance des cellules pour obtenir un tissu, à l'aide s'il le faut de facteurs extérieurs moléculaires ou mécaniques. Le produit final est enfin greffé avec l'espoir que l'implant se développe, s'intègre et apporte l'amélioration souhaitée. Le but n'est pas toujours la greffe mais également d'apporter un modèle pour des études fondamentales sur les relations cellule-structure et intercellulaires en conditions normales et pathologiques.

Les sources cellulaires sont nombreuses puisqu'il peut s'agir de cellules autologues comme de cellules allogéniques. Idéalement, elles doivent être faciles à prélever, amplifiables, non immunogènes et capables de se différencier en cardiomyocytes matures et fonctionnels, pour le tissu qui nous intéresse. Pour ce qui concerne la thérapie cardiaque, différents types cellulaires ont été utilisés, telles que des cardiomyocytes fœtaux, des myoblastes des muscles squelettiques, des cellules souches mésenchymateuses, des cellules brutes issues de la moelle ou encore des cellules hES (pour revue, Leor, Amsalem et al. 2005). Zimmermann et collaborateurs ont défini une sorte de cahier des charges réclamant au produit d'être : 1) contractile, 2) électrophysiologiquement stable, 3) mécaniquement robuste tout en restant flexible, 4) vascularisé ou tout au moins rapidement vascularisé après implantation et enfin 5) non immunogène (Zimmermann, Melnychenko et al. 2004).

Les cellules sont associées à des structures de soutien dont la nature, l'organisation, les contacts établis permettent l'amplification et/ou la différenciation des cellules, de façon à former une structure tissulaire en trois dimensions. Souvent, en plus de l'échafaudage, des facteurs externes sont introduits pour stimuler une signalisation cellulaire connue pour induire la formation du tissu. Le problème principal réside dans la faible maîtrise de ces signaux dont les effets sont connus *in vivo* mais difficilement reproductibles *in vitro*.

Certains ingénieurs ont développé des bioréacteurs qui permettent d'appliquer des principes de dynamique des fluides. Toutefois, des turbulences créées par ces agitations ont des effets néfastes sur les cellules. Une alternative est de générer un flux laminaire dynamique par un environnement de fluide rotatif. C'est ce que proposent des bioréacteurs rotatifs (rotating-wall

vessels (RWV) bioreactor). Les tissus cardiaques obtenus avec ce matériel sont constitués de cellules allongées qui se contractent spontanément et de manière synchrone (Carrier, Papadaki et al. 1999)

Lorsque le produit tissulaire est obtenu, il faut l'implanter dans l'organe ou le tissu lésé. Tout en s'appliquant à ce que la greffe ne provoque ni rejet, inflammation, carcinogénéicité ou formation de tératome, l'implant doit être vascularisé et innervé. Pour la question de la vascularisation, une solution serait de choisir un lieu d'implantation riche en vaisseaux qui pourront irriguer l'implant. Malheureusement, cela n'est pas toujours possible, l'idéal serait donc que l'implant contienne des vaisseaux que l'on connecterait à ceux de l'hôte lors de l'implantation. En attendant qu'une telle prouesse soit réalisable, les tentatives de formation de vaisseaux rudimentaires à partir de cellules épithéliales présentes au moment de la fabrication du tissu *ex vivo* apportent des résultats enthousiasmants (Black, Berthod et al. 1998).

En 2000, Leor et collègues ont greffé des cardiomyocytes fœtaux de rats qui avaient mûri à partir d'un échafaudage poreux (Leor, Aboulafia-Etzion et al. 2000). Les cellules greffées présentaient une bonne survie, et une bonne maturation *in situ*, avec une néovascularisation intense. Même si les bienfaits fonctionnels observés ne sont pas dus aux cardiomyocytes greffés, il reste néanmoins que la faisabilité d'une telle greffe est prouvée. Par la suite, Zimmermann et ses collègues ont implanté leur EHT (Engineered Heart Tissue) dans des cœurs de rats sains (Zimmermann, Didie et al. 2002). La maturation des cellules, bien qu'accompagnée d'une haute vascularisation de la structure bien organisée n'a pas apporté d'amélioration fonctionnelle et a déclenché un rejet immunitaire.

Une fois la structure vascularisée, l'environnement est propice à la régénération tissulaire. Pour accélérer la vascularisation et la prise de la greffe, le biomatériau implanté peut être imprégné de facteurs qui vont améliorer la survie et la réparation. Les cellules progénitrices cardiaques seraient alors recrutées pour aider à la réparation (Leor and Cohen 2004). Un avantage énorme qu'ont apporté les travaux de Leor et ses collaborateurs est l'usage d'une approche basée sur l'utilisation de cathéters et qui éviterait ainsi une chirurgie lourde d'ouverture du thorax (Leor and Cohen 2004).

De manière très intéressante, des cellules ES de souris ont été greffées (Kofidis, de Bruin et al. 2004). Les cellules, mélangées à du Matrigel liquide forment un tissu bioartificiel liquide qui, une fois implanté dans un cœur de rat infarci, permet la restauration du myocarde sans affecter sa géométrie.

Des avancées spectaculaires ont été réalisées ces dernières années et les recherches fondamentales sur les relations cellules/matrice permettront de progresser encore dans ce domaine. La considération des interactions cellules-matrice est la clé des succès à venir. Le choix et la fabrication des matériaux découlent de cet aspect. Un consortium européen a été créé pour permettre les échanges, entre autres, entre ingénieurs et chercheurs fondamentaux pour que les premiers puissent bénéficier des dernières découvertes et ainsi les intégrer au développement de nouvelles technologies de réparation tissulaire (European Commission Sixth Framework Project Consortium).

Un autre défi reste celui de développer, appliquer des procédés qui permettront de passer au stade clinique, c'est à dire de pouvoir se placer dans des conditions de bonnes pratiques de laboratoire, assurant une certaine reproductibilité et une standardisation des procédures, tout en restant dans un coût raisonnable. Le développement de bioréacteurs présente l'espoir de procédés automatisables.

Résultats

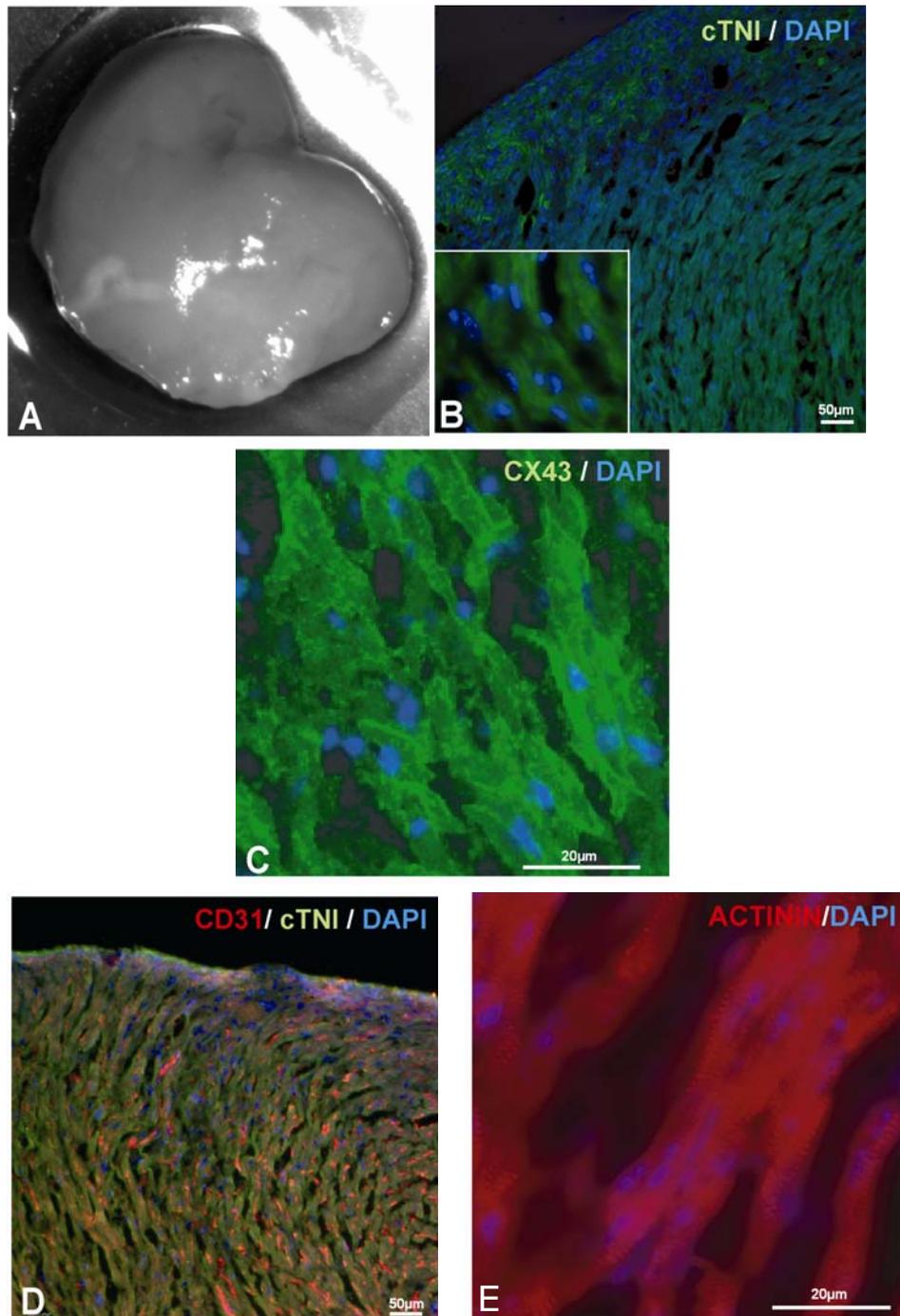


Figure A1 : Histologie de tranches de cœur de rat après 1 mois en culture

(A) vue au stéréomicroscope, (B) immunomarquages anti-troponine I (vert), (C) anti-connexine 43 (vert), (D) anti CD31 (rouge) et (E) anti-l'alpha-actinine sarcomérique (rouge). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (bleu).

1^{ère} partie: Mise au point d'un modèle organotypique battant de cœur : applications à la thérapie cellulaire et l'étude fonctionnelle de composés pharmacologiques

1 Objectif de l'étude

Les hES sont une source prometteuse de cardiomyocytes puisqu'elles semblent être les seules cellules capables de se différencier de façon terminale. Les essais de transplantation menés jusqu'ici avec différents types cellulaires posent tous la question de comment se comportent les cellules greffées. Au début de cette étude il n'existait pas de modèle *in vitro* permettant de tester l'intégration de ces cellules dans un modèle dont l'architecture tridimensionnelle était préservée au-delà de trois semaines. Sur la base de ce qui avait été développé pour les cultures organotypiques de cerveau, nous avons mis en place un modèle de culture organotypique de cœur qui s'est révélé battant, et donc un outil précieux pour étudier l'implantation des cellules hES mais aussi l'effet d'agents pharmacologiques.

2 Principaux résultats

Au cours de la culture, les tranches présentent une morphologie similaire 24h ou 3 mois après la mise en culture : elles ne s'étendent pas et ne semblent pas subir de remaniement structural majeur (**figure A1A**). Cette stabilité macroscopique a pu être vérifiée au niveau microscopique : l'organisation spatiale des cellules du tissu, révélée par un marquage avec un anticorps dirigé contre la Troponine I et l'alpha-actinine sarcomérique montre que les cellules ont conservé un alignement et une morphologie allongée typique des cellules cardiaques, avec éventuellement un léger désordre (**figure A1B, D et E**) (**figure A1B, D**). Les connexines 43 sont également exprimées et leur distribution ponctuelle sur la membrane est comparable à ce qui est observé sur une section histologique de cœur (**Figure A1C**). Le marquage contre CD31 démontre de plus la présence d'un réseau régulier de capillaires sanguins dans les cultures organotypiques de tranches de cœur, comparable à celui observé classiquement dans des sections d'organe (**Figure A1D**).

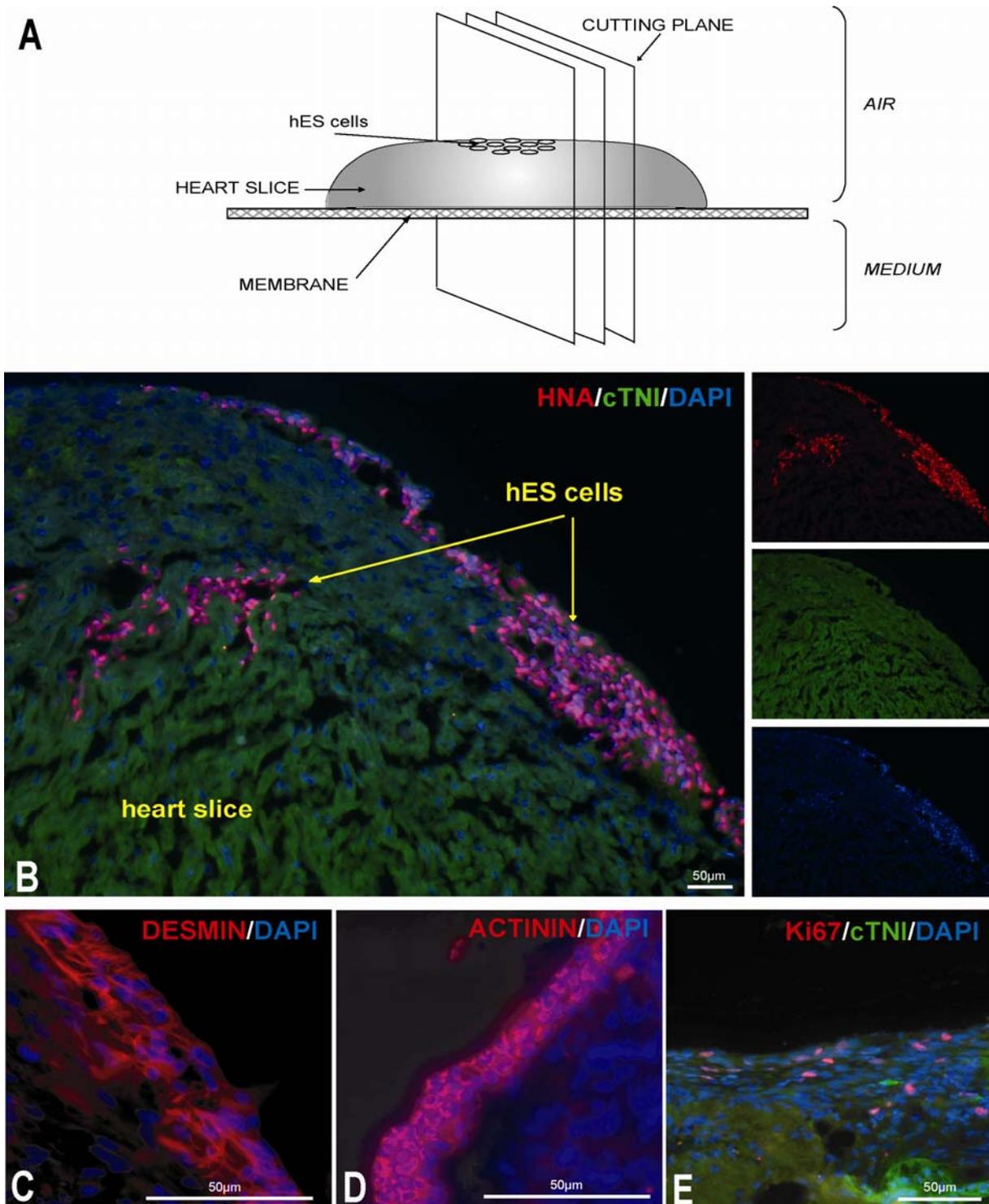


Figure A2 : Greffe de cellules hES dans les tranches organotypiques de coeur

(A) représentation schématique de la géométrie de la tranche, de la membrane, des cellules greffées et plan de coupe (B) La présence de cellules humaines, dans le parenchyme cardiaque, 60 jours après injection est détectée par marquage contre les noyaux humains (HNA)(rouge), au sein de la tranche révélée par le marquage la Troponine I (vert), les noyaux humains et de rat sont marqués au DAPI (bleu). (C) marquages anti-desmine (rouge), (D) anti-actinine humaine (rouge) et (E) anti-Ki67 (rouge).

La différenciation des cellules hES en cardiomyocytes après transplantation dans les tranches

Soixante jours après transplantation de cellules hES indifférenciées dans les tranches, on peut observer un marqueur spécifique humain (HNA, Human Nuclear Antigen). Les cellules marquées sont donc bien les cellules injectées (**Figure A2B**). On peut ainsi se rendre compte de la répartition des cellules injectées dans la tranche, en se repérant grâce au schéma de coupe des tranches après plusieurs semaines en culture (**Figure A2A**). Les cellules humaines semblent regroupées en « paquets » à la surface de la tranche, formant des couches par endroits (**Figure A2B**), mais on les retrouve aussi dispersées dans la tranche, aux interstices entre les cellules de la tranche et à proximité des vaisseaux (**Figure A2B**). La grande majorité des cellules humaines ($81 \pm 2.3 \%$) sont localisées dans une épaisseur de $250 \mu\text{m}$ à partir de la surface de la tranche (**Figure A3**). Deux mois après injection, les cellules greffées expriment des marqueurs cardiaques tels que l' α -actine (**figure A2D**) et la desmine (**figure A2C**) détectées par immunofluorescence, sans qu'il y ait de réaction croisée avec les cellules de rat. L'expression de marqueurs cardiaques a été détectée par PCR en temps réel à 10, 20, 30, 40, 50 et 60 jours après injection des cellules hES indifférenciées (**Figure A3**). Nous observons ainsi une diminution de l'expression des marqueurs de l'état indifférencié Oct-4 et Nanog au cours de premières semaines de culture (**Figure A4A**). A partir du dixième jour, on détecte l'expression de Gata4 et Mef2C qui augmente jusqu'à atteindre un pic à 1 mois, indiquant une différenciation cardiaque (**Figure A4B**). Après deux mois, les cellules expriment la chaîne légère de myosine 2a (MLC2a), la chaîne lourde de myosine β (β -MHC), et le peptide natriurétique atrial (ANP), trois marqueurs cardiaques tardifs (**Figure A4C**). Par ailleurs, nous avons pu trouver des cellules en division, après 2 mois de culture, par un marquage contre le Ki-67 (**figure A2E**).

De plus, les immunomarquages avec des anticorps dirigés contre des marqueurs de l'endoderme et de l'ectoderme se sont révélés négatifs. Il n'y a pas eu non plus de formation de tératome dans les tranches de cœur de rat après injection de cellules hES indifférenciées.

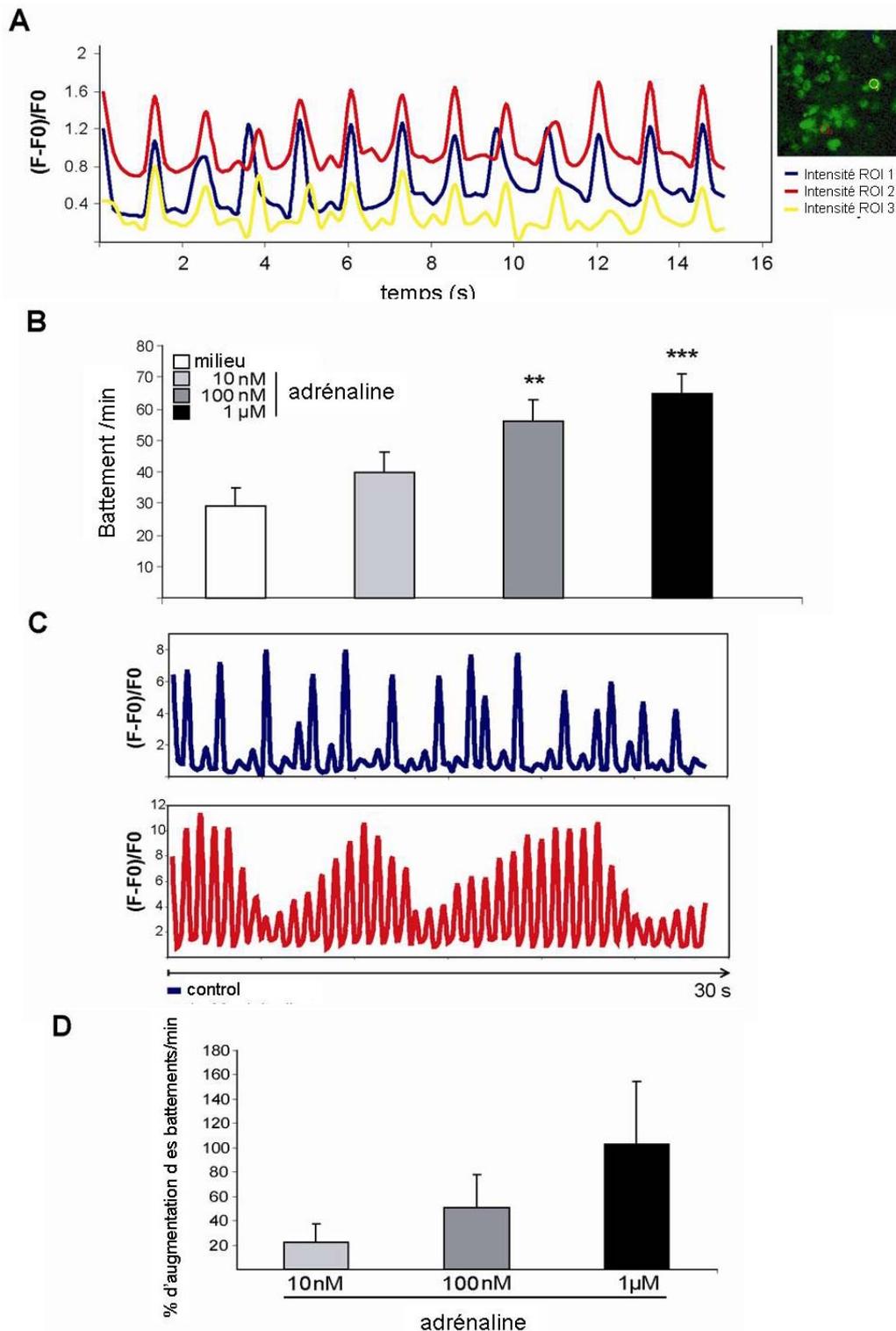


Figure A5: caractérisation des contractions spontanées des cœurs humains et de rat.

(A) Pics de Ca^{2+} à l'intérieur des régions d'intérêt (ROI) d'une tranche de cœur de rat chargée en Fluo-4. les enregistrements sont exprimés en $\Delta F/F_0$ ou F_0 est le niveau le plus bas de fluorescence. (B) Effets fonctionnels de l'adrénaline sur les tranches de cœur dans les cultures organotypiques. La fréquence des battements de tranche de rat augmente de manière dose-dépendante. * $p \leq 0,05$ et *** $p \leq 0,001$ par rapport aux tranches contrôles (test de Student après ANOVA). Les données sont exprimées en moyennes \pm e.s.m, $n=23$. (C) Pics de Ca^{2+} enregistrés sur des cultures de tranches de cœur de rat chargées en Fluo-4 au repos et en présence d'adrénaline. (D) Augmentation de fréquence de battement des tranches humaines de cœur au cours de l'application d'adrénaline par rapport au contrôle. Moyennes \pm e.s.m, $n=5$.

Les tranches de cœur montrent des contractions spontanées pendant plusieurs mois de culture

A notre grande surprise, l'observation quotidienne des tranches sous le stéréomicroscope nous a révélé que la majorité des tranches faisaient preuve de contractions spontanées et rythmées. Un relevé systématique de ces contractions a indiqué qu'elles ne concernent pas toujours la même zone de la tranche d'un jour à l'autre. Ce phénomène de contraction apparaît dans des tranches ayant reçu ou non des cellules, ce qui suggère que les battements sont le résultat, soit d'une propriété fonctionnelle intrinsèque à la tranche, soit du protocole d'obtention des tranches.

Les contractions apparaissent de manière macroscopique comme une déformation d'une ou plusieurs régions de la tranche, et d'une observation à l'autre, ces régions au sein d'une tranche ne sont pas les mêmes. La durée des contractions n'excède pas quelques centaines de millisecondes. Le nombre de contractions est régulier au sein d'une région contractile pendant le temps d'observation, mais deux régions d'une même tranche peuvent battre de manière asynchrone. La fréquence de contraction est assez basse, autour de 30-40 battements par minutes (bpm). Le suivi des fréquences de battements spontanés des tranches à intervalles réguliers sur 81 jours montre un très faible changement dans le taux de contraction au cours du temps. La majorité des enregistrements ont été réalisés à 37°C mais une baisse de température en-dessous de 25°C n'a pas montré d'impact sur la fréquence de contraction.

Les contractions rythmées des tranches de cœur organotypiques sur membranes semi-poreuses sont associées aux ondes calciques et sont modulées par l'adrénaline

Nous avons exploré les mécanismes physiologiques qui sous-tendent les battements des tranches de cœur en chargeant les cultures organotypiques en Fluo-4 AM ester. Les analyses au microscope confocal de l'intensité de fluorescence au cours du temps montrent des oscillations calciques rythmées dans différentes régions de la tranche de cœur. Une quantification de ces oscillations calciques montre que leur rythme est similaire à celui des contractions observées au niveau macroscopique. Les ondes calciques sont régulières, non seulement au cours du temps mais aussi en amplitude à chaque point d'enregistrement, où les cellules sont excitées de manière synchrone (**figure A5A**).

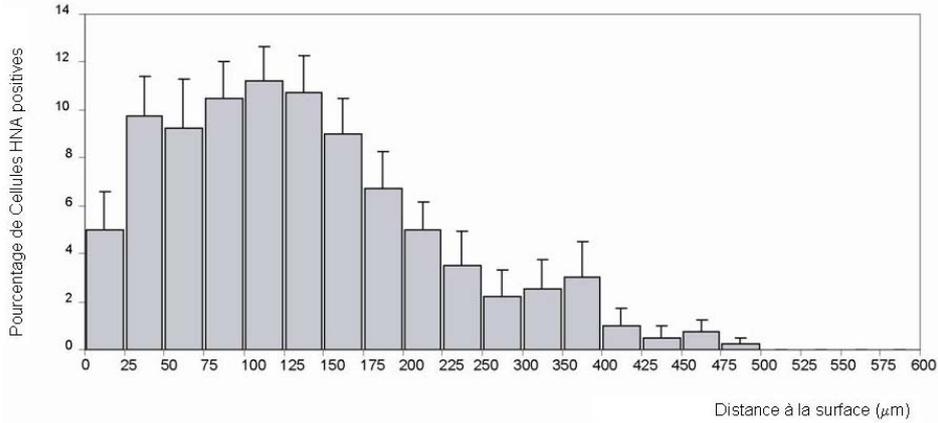


Figure A3: proportion de cellules hES en fonction de leur profondeur à l'intérieur de la tranche 2 mois après greffe.

Les données sont exprimées en \pm e. s. m (écart standard à la moyenne) et les mesures ont été réalisées tous les 25 μ m à partir de la surface (n=5). La largeur moyenne des tranches entière est de $800\mu\text{m} \pm$ e.s.m.

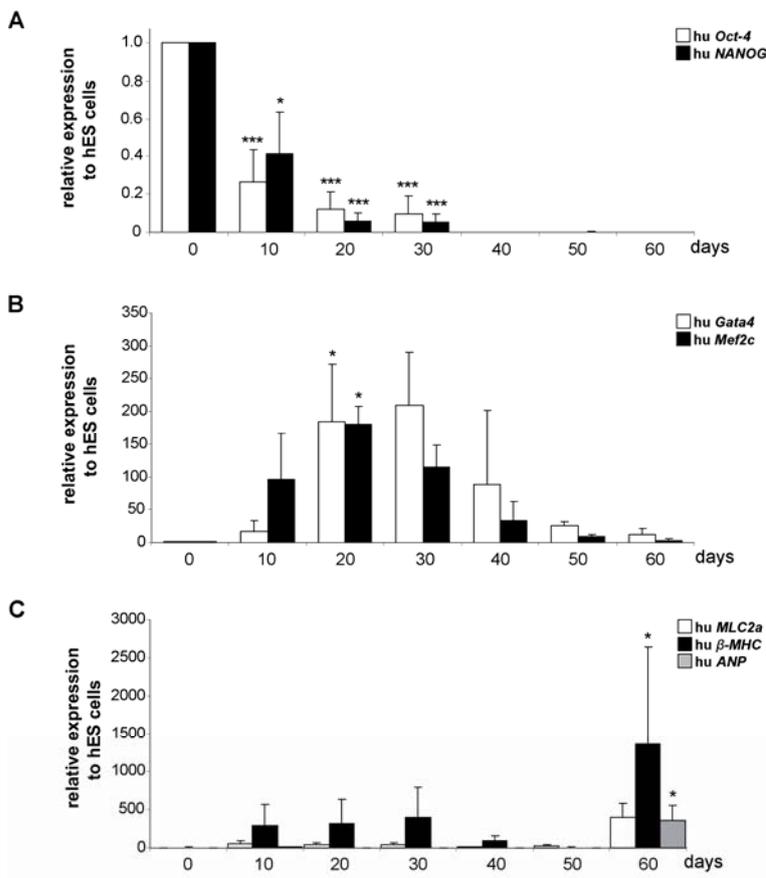


Figure A4 : Expression de marqueurs humains

(A) Analyse par PCR en temps réel de l'expression d'Oct-4 et Nanog, (B) Gata4 et Mef2C, (C) MLC2a, β -MHC et ANP à différents temps après implantation de cellules hES à l'état indifférencié dans les tranches de cœur de rat. * $p \leq 0,05$ et *** $p \leq 0,001$ par comparaison aux cellules hES au jour 0 (test de Dunnett après ANOVA). Les données sont des moyennes \pm e.s.m.

Nous avons évalué notre modèle pour sa capacité à répondre, *via* ses récepteurs β -adrénergiques, à la présence de drogues inotropes (qui modifient les contractions du muscle cardiaque) et chronotropes (qui commande la régularité du rythme) dans le milieu extérieur. En présence de doses croissantes d'adrénaline (un inoconstricteur) dans le milieu de culture des tranches, la fréquence des contractions augmente (**Figure A5B**). En parallèle, une analyse au microscope confocal des courants calciques dans les tranches de cœur chargées en fluo-4 AM montre une augmentation des pics de fluorescence en amplitude ainsi qu'en fréquence (**figure A5C**).

Les cultures organotypiques de tranche de cœur humain à l'interface air-milieu sur des membranes semi-poreuses

L'opportunité s'est présentée au laboratoire de disposer de fœtus humains âgés de 8 et 9,5 semaines. Nous avons mis en culture des tranches d'1mm d'épaisseur à partir de ces échantillons. Nous les avons maintenu en culture pendant 60 jours et avons évalué leurs caractéristiques macroscopiques sur le long terme. Les tranches ont conservé leur morphologie, sans s'étendre ni présenter de remaniement structural majeur et présentent un battement régulier, observable sur toute la durée de culture. Le taux de battement est comparable à celui observé à partir des tranches de cœur de rat (entre 30 et 40 bpm).

Pour estimer l'intégrité fonctionnelle, nous avons analysé la réponse à la présence de différentes doses d'adrénaline dans le milieu. La fréquence de contraction des tranches augmente de manière dépendante de la dose d'adrénaline introduite (**Figure 5D**).

3. Interprétation des résultats

Notre modèle supporte la culture sur le long terme en présentant une intégrité préservée dans la constitution tissulaire et dans sa fonctionnalité, et en répondant à l'exposition à des drogues connues pour affecter la physiologie cardiaque. Les cultures organotypiques peuvent donc être envisagées pour des tests pharmacologique : les tests sont rapides et faciles à mettre en place et les réponses facilement obtenues par des procédés qui permettent une analyse rapide. Nous avons aussi montré que notre modèle constituait un bon support pour injecter des cellules hES. Celles-ci ont montré qu'elles pouvaient survivre et se différencier au sein des tranches. Nous avons donc un support pour étudier le devenir des cellules greffées.

corps embryoïdes	Non différencié	Marqueur 3 feuillets	Différenciation cardio précoce		Différenciation cardio tardive				
	OCT-4	alpha-actine cardiaque	GATA4	Nkx2.5	ANF	alpha-actinine	cTnI	MLC-2a	MLC-2V
1A2	+	+	+	+	+			+	+
1B3	+	+	+					+	
1C3		+	+	+	+	+	+	+	
1D1		+	+	+	+		+	+	
3B1	+	+	+		+	+	+	+	+
3B5		+			+	+	+	+	+
4D4		+	+					+	
4D6		+	+					+	
4B6		+	+					+	
4C2	+	+	+				+	+	
4D6	+	+						+	
5D4		+	+					+	
6B6	+	+	+	+				+	
6C3	+	+	+	+	+	+		+	

Tableau RT1 : récapitulatif des marqueurs exprimés dans les corps embryoïdes prélevés à J24

+ : détection

Les cases vides signifient qu'il n'y a pas eu de détection.

Les noms des corps embryoïdes en rouge indiquent les battants, en noir, les non-battants. Les différents marqueurs détectés par PCR sont le marqueur d'indifférenciation OCT4, les facteurs de transcription cardiaques précoces Nkx2.5 et GATA4, et les gènes de protéines de structure alpha actine cardiaque, Atrial Natriuretic Factor (ANF), alpha-actinine, la troponine cardiaque I (cTnI), les chaînes légères de myosines atriale (MLC-2a) et ventriculaire (MLC-2V).

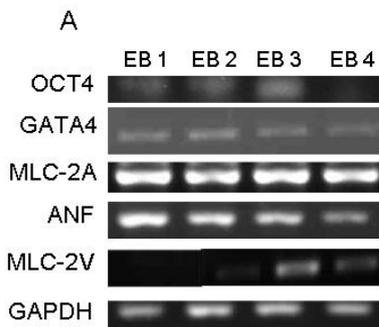


Figure R1 : résultats préliminaires de différenciation cardiaque

Les corps embryoïdes obtenus avec la lignée SA01 à 24 jours expriment des marqueurs cardiaques précoces (GATA4) et tardifs (MLC-2A, ANF, MLC-2V). La GAPDH a été choisie comme gène de ménage.

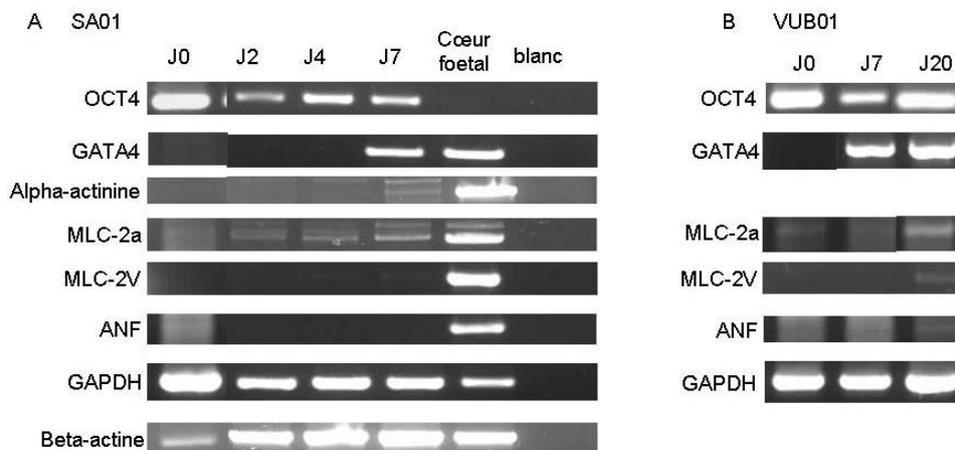


Figure R2 : Suivi au cours du temps de la différenciation cardiaque.

Les marqueurs cardiaques ont été analysés par RT-PCR sur les corps embryoïdes formés à partir des cellules des deux lignées et arrêtés à J0, J2, J4 J7 (SA01, panel A) ou J0, J7 et J20 (VUB01 panel B). la GAPDH et la beta actine (A) ou la GAPDH seule (B) ont été utilisées comme contrôle interne.

2^{ème} partie: optimisation des protocoles d'obtention des cellules cardiaques pour la thérapie

1. Objectif de l'étude

Les cellules ES sont, à notre connaissance, les seules cellules capables de se différencier en cardiomyocytes après transplantation. Le réel défi reste dans l'obtention d'une population homogène de cellules qui permettront, avec un rendement efficace, de reconstruire un organe lésé. C'est dans ce but que j'ai développé plusieurs protocoles pour obtenir des cardiomyocytes, soit en induisant les cellules par la présence de facteurs de croissance connus pour avoir un rôle dans la différenciation cardiaque, soit en recherchant des populations de progéniteurs cardiaques, ou bien encore en utilisant des bioréacteurs.

2. Principaux résultats

1. Evaluation du potentiel cardiogénique des lignées SA01 et VUB01

Les lignées de cellules hES peuvent présenter des différences quant à leur potentiel de différenciation. 10 à 20 jours après la formation des corps embryoïdes, on observe 8 à 10% de zones battantes dans les deux lignées utilisées. L'étude des profils d'expression d'un certain nombre de marqueurs dans des corps embryoïdes battants et non battants montre qu'à J24, 50% des corps embryoïdes expriment faiblement OCT4. L'ensemble des corps embryoïdes exprime GATA4, l' α -actinine, et MLC2a. Par contre, les autres marqueurs (Nkx2.5, ANF, alpha-actine, cTNI et MLC2v), ils sont exprimés essentiellement dans les corps embryoïdes battants (**Tableau RT1 1et Figure R1A**).

Pour préciser ces expressions, nous avons procédé à une cinétique en prélevant des cellules à différents temps de la différenciation (J0, J2, J4, J7, J20) avec les deux lignées. Comme contrôle positif, nous avons testé l'expression des marqueurs cardiaques dans le cœur fœtal. A J0, OCT4 est exprimé dans les deux lignées. A J7, GATA est exprimé dans les cellules des 2 lignées, continue d'être exprimé à J20 et est retrouvé dans le cœur fœtal. MLC2a est exprimé assez tôt dans les cellules SA-01. On peut voir deux bandes distinctes, au même niveau que celles détectées dans l'échantillon de cœur fœtal, dès J2 alors qu'il n'apparaît pas à J7 dans les cellules VUB01 mais est détecté à J20. MLC2v n'est pas détecté dans les SA01 aux temps

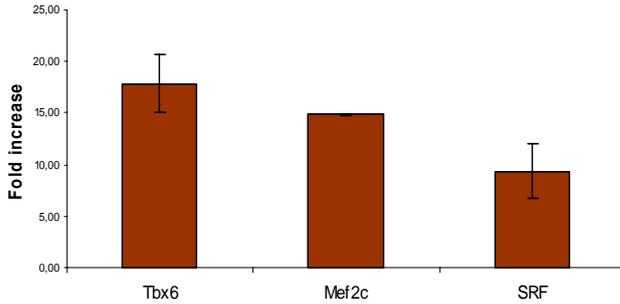
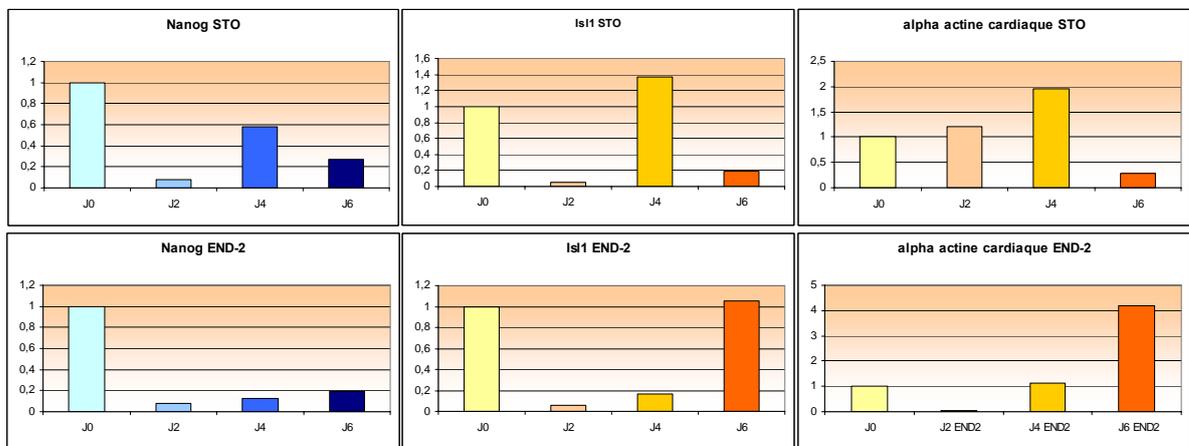


Figure R3 : Effet de l'induction au BMP2 et SU5402 sur les cellules hES

Les expressions détectées par PCR quantitative sur des cellules incubées pendant 48h en présence de BMP2 et SU5402 sont exprimées par rapport aux cellules avant incubation. Les marqueurs suivis sont Tbx6, (T-box factor) MEF-2C (Myocyte Enhancer Factor 2C) et SRF (Serum Response Factor).

A



B

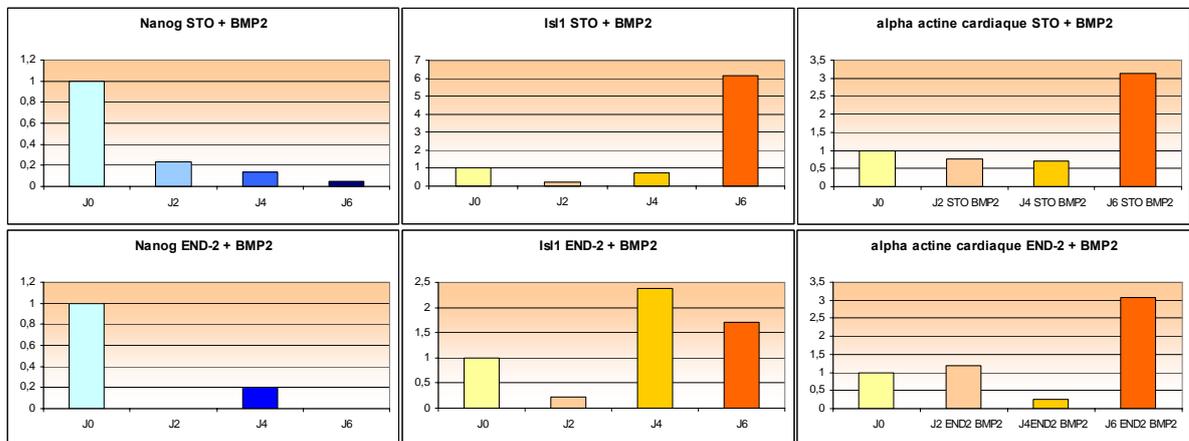


Figure R4 : Effet de l'induction par coculture avec les cellules END-2 et/ou traitement au BMP2 et SU5402 sur les cellules hES

Les graphes représentent les résultats de PCR quantitative sur les cellules co-cultivées pendant 2, 4 ou 6 jours avec des cellules nourricières inertes (STO) ou type endoderme viscéral (END-2) sans traitement (A) et avec traitement au BMP2 et SU5402 (B). Les marqueurs testés sont Nanog, Isl1 et l' α -actine cardiaque.

Les expressions à J0 servent de référence et sont donc fixées à 1.

L'expérience n'a été réalisée qu'une fois.

précoces mais est détecté dans le témoin positif. Il est aussi détecté dans les VUB-01 à J20 (bande discrète opposée aux bandes diffuses détectées à J0 et J7) (**Figure R2**).

Les deux lignées présentant le même potentiel à donner des cardiomyocytes, nous avons ensuite réalisé les différentes expériences d'optimisation de protocoles sur la lignée SA01.

2. Optimisation des protocoles d'obtention des cardiomyocytes

2.1. Effet de l'induction des cellules hES par ajout de facteurs et/ou par co-culture sur cellules nourricières

Lorsque les cellules sont cultivées 48h en présence de BMP2 (10 ng/ml) et SU5402 (10 μ M), un inhibiteur du récepteur au FGF2, l'expression des marqueurs de différenciation cardiaque précoce est augmentée de $17,86 \pm 2,7$ fois pour Tbx6, $14,86 \pm 0,1$ fois pour Mef2C et $9,37 \pm 2,57$ fois pour SRF, par rapport aux cellules non traitées (**figure R3**).

Nous avons ensuite étudié l'effet de la coculture des cellules hES avec les cellules END-2 à des temps précoces après la mise en coculture (J0, J2, J4 et J6) pour lesquels l'effet des cellules endodermique est maximum. Dans les différentes conditions, les cellules présentent une expression de Nanog diminuée par rapport à J0 (**figure R4**). Les cellules cultivées sur STO ou sur END-2 expriment Isl1 et l' α -actine cardiaque et cette expression augmente progressivement au cours du temps (**figure R4A**). Les cellules hES cocultivées avec les cellules END-2 expriment 5 fois plus Isl1 et 16 fois plus l' α -actine cardiaque que lorsqu'elles sont cultivées sur STO (**figure R4A**).

Par la suite, nous avons testé la combinaison de la co-culture et de l'ajout de BMP2 et de SU5402 dans le milieu de culture. A partir de J2, les marqueurs cardiaques sont exprimés avec une augmentation de l'expression au cours du temps, dans les deux types de co-culture (**figure R4B**). A 6 jours de différenciation, l'effet seul du traitement aux [BMP2 + SU5402] sur les cellules hES sur STO s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'Isl1 d'un facteur 30 et de l' α -actine cardiaque, d'un facteur 15. Isl1 est 7 fois plus exprimé dans les cellules traitées et cultivées sur STO. L'expression d'Isl1 dans les cellules co-cultivées sur END-2 sans traitement aux [BMP2 + SU5402] est 4 fois plus intense que dans les mêmes cellules traitées durant 6 jours. La différence d'expression de l' α -actine cardiaque est quasi nulle lorsque les cellules co-cultivées sur END-2 sont traitées ou non aux [BMP2 + SU5402].

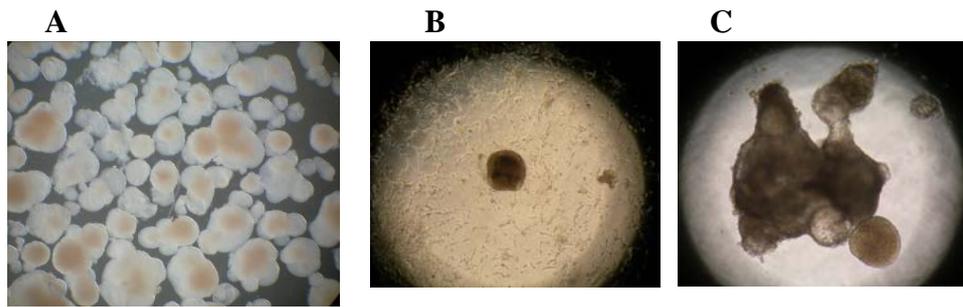


Figure R5 : Les corps embryoides ne présentent pas la même morphologie selon le mode de culture

A 8 jours de culture, les corps embryoides formés en bioréacteurs STLV(A et B) ou en boîte de Pétri non traitée culture (C) ont été observés au microscope inversé (X5).

Profil d'expression des cellules de corps embryoides prélevés à 8 jours

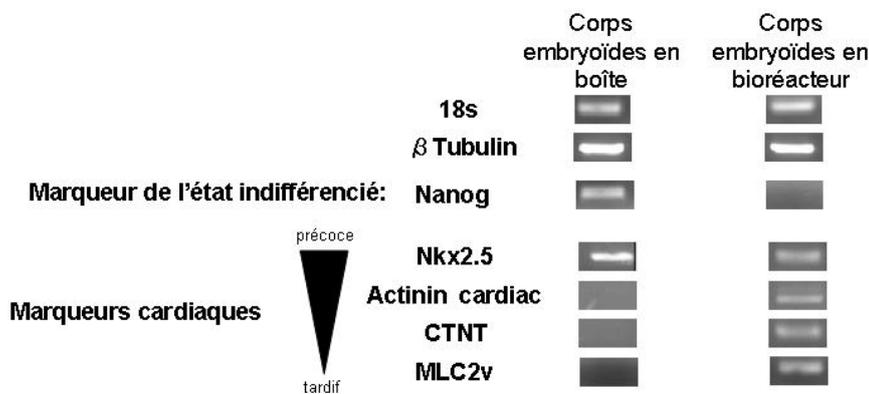


Figure R6 : Différences d'expression des marqueurs des corps embryoides cultivés en boîte et en bioréacteur

Les marqueurs cardiaques ont été analysés par RT-PCR sur des corps embryoides après 8 jours de culture en boîte de Pétri ou en bioréacteur. Pour contrôle, l'ARN 18S et la Tubuline beta II ont été détectés.

2.2. Effet de la culture en bioréacteur sur la différenciation cardiaque

On observe après 8 jours que les corps embryoïdes cultivés en boîte de Pétri et en bioréacteur diffèrent au niveau de la morphologie. Les corps embryoïdes cultivés en bioréacteurs sont plus homogènes en taille et semblent être composés de cellules organisées de manière plus dense (**figure R5A et R5B**) que dans les corps embryoïdes formés de manière statique. En effet, dans les boîtes de Pétri, on peut observer que certains corps embryoïdes sont agrégés entre eux et des vésicules apparemment vides y sont parfois associées (**figure R5C**). L'étude des gènes exprimés dans les cellules cultivées en bioréacteur et en boîte montre qu'à 8 jours de différenciation, alors que les cellules agrégées en boîte expriment encore Nanog, l'expression de ce marqueur n'est pas détectée dans les corps embryoïdes formés en bioréacteurs STLV (**figure R6**). A l'inverse, alors que les corps embryoïdes en boîte, à 8 jours, n'expriment pas de marqueurs cardiaques, excepté NkX2.5, ceux cultivés en bioréacteur STLV présentent une expression de marqueurs précoces et tardifs (**figure R6**).

2.3. Etablissement d'une population triée sur l'expression de KDR

Nous avons recherché à établir une population de cellules précurseurs cardio-vasculaires.

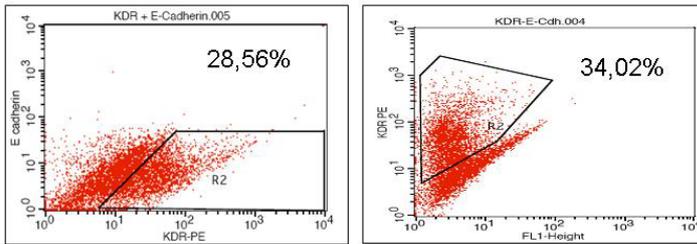
Un tri sur l'expression de KDR à un stade précoce de la différenciation constitue la première étape pour obtenir une telle population. Avant de procéder à ce tri, nous avons établi par FACS à quel jour de la différenciation se placer. Les FACS réalisés sur les corps embryoïdes prélevés à J3 montrent que 31,29 % \pm 3,85 de cellules expriment KDR suivant les expériences, contre 9,16% à J4 (**figure R7**).

Les cellules triées à J3, pour l'expression de KDR en excluant celle de l'E-cadhérine et remises en culture sur OP-9, sont de nouveau passées au FACS pour tester l'expression de KDR et de CXCR4. A 7 jours après le début de la différenciation, et donc 4 jours après le tri, on observe une expression de KDR mais pas de CXCR4 (**figure R8**).

3. Interprétation des résultats

Les cellules hES utilisées au laboratoire ont révélé un potentiel de différenciation cardiogénique semblable à celui décrit pour d'autres lignées. Les différentes stratégies abordées pour optimiser le protocole de différenciation cardiaque ont apporté des résultats encourageants indiquant que ces orientations sont à poursuivre pour obtenir des populations

SA-01 J3



SA-01 J4

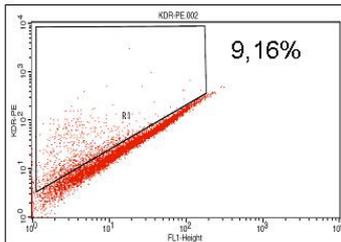


Figure R7 : Expression de KDR à différents temps de la différenciation cardiaque

Les cellules dissociées à partir de corps embryoides de 3 ou 4 jours de différenciation sont passées au FACS. A 3 jours, les corps embryoides contiennent en moyenne $31,29\% \pm 3,85$ de cellules KDR+, alors qu'à J4, on n'en dénombre que 9,16%.

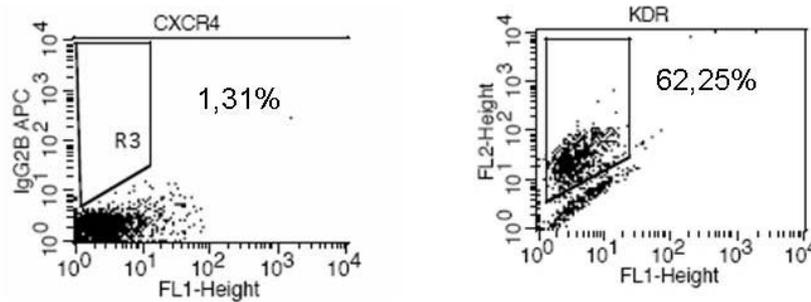


Figure R8 : Expression de KDR des cellules triées

Des cellules triées et ensemencées sur OP9 sont passées au FACS pour l'expression de KDR et CXCR4 à J7.

de cellules à greffer. Les bioréacteurs, initialement envisagés pour répondre à la question de quantité offrent en plus la possibilité d'homogénéiser les populations cellulaires cultivées par ce procédé. Les résultats préliminaires apportés en abordant la piste de recherche de progéniteurs sont encourageants et ouvrent une voie prometteuse.

Matériel et méthodes

L'expérimentation a été réalisée en respectant strictement les recommandations du Comité d'Éthique Européen (EEC) (86/609 EEC), du comité national français d'éthique (87/848) et des US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) pour le traitement et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les embryons humains ont été obtenus après avortement avec le consentement parental pour usage scientifique auxiliaire à un protocole clinique en cours visant la greffe de neurones fœtaux chez des patients atteints de la maladie de Huntington ("MIG-HD", ref. NCT00190450). Cette recherche est conforme aux principes établis dans la Déclaration d'Helsinki.

Culture et différenciation des cellules hES

Les lignées SA01 (Cellartis, Suède) et VUB01 (dérivée à l'University Hospital and Medical School of the Vrije, Université Brussel (Mateizel, De Temmerman et al. 2006)) sont disponibles au laboratoire depuis respectivement février et juillet 2005. Elles sont cultivées sur des cellules nourricières fibroblastiques de souris (STO) dont la prolifération est bloquée par un traitement à la mitomycine C dans du milieu composé de knockout Dulbecco's modified Eagle's medium (KO-DMEM), 20% de knockout serum replacement (KSR), 1 mM glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1% d'acides aminés non essentiels (provenant tous d'Invitrogen, Cergy). Ce milieu est le milieu d'entretien des cellules, noté par la suite milieu hES et il est supplémenté en FGF2 (4 ng/ml) pour maintenir les cellules à l'état indifférencié. Tous les jours, le milieu est renouvelé de moitié.

Les cellules sont passées mécaniquement pour maintenir un stock, par découpe manuelle des colonies sous loupe binoculaire et transfert des morceaux de colonies dans des boîtes contenant des STO fraîchement mitomycinées. Pour amplifier les cellules à des fins d'expériences de différenciation, le passage est enzymatique : les colonies sont traitées à la collagenase IV (1 mg/ml, 30 min à 37°C). Les boîtes sont ensuite rincées deux fois avec du milieu et grattées avec une pipette en plastique. Le milieu est précautionneusement aspiré, transféré dans un tube conique de 15 ml pour séparer les cellules des cellules nourricières par sédimentation. Les agrégats de cellules hES sont calibrés par passage sur tamis cellulaire (70 μ m, Becton Dickinson, Le-Pont-de Claix) puis laissés à sédimenter. Après élimination du surnageant, les cellules sont reprises de façon à ensemercer avec un ratio d'1:5 des flasques de 300 cm² contenant des STO mitomycinées. 7 jours après ensemencement, chaque flasque contient approximativement 50 millions de cellules hES indifférenciées.

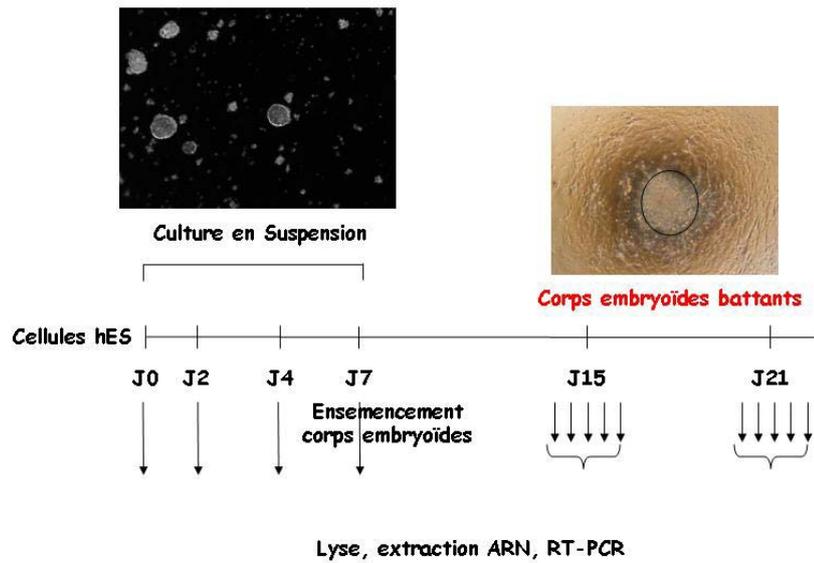


Figure MM1: schéma de protocole de différenciation cardiaque à partir des cellules hES.

A J0, les cellules sont placées en suspension dans du milieu dit de différenciation contenant 20% de sérum de veau fœtal. Les cellules s'agrègent pour former des corps embryoides visibles au microscope au grossissement x5 (panel de droite). Entre J7 et J10, les corps embryoides sont ré-ensemencés sur un support gélatiné et cultivés dans le même milieu de différenciation. Les corps embryoides s'étalent et les cellules prolifèrent. A partir du 10^e jour de différenciation, on peut voir apparaître des zones battantes au sein des corps embryoides (zone entourée dans panel de droite).

Différenciation des cellules par le protocole des corps embryoïdes

Pour induire la différenciation cardiaque, nous avons appliqué la méthode des corps embryoïdes illustrée **figure MM1** : les cellules sont transférées dans des boîtes de Pétri de faible capacité d'attachement, dans du milieu de différenciation composé de KO-DMEM, 20% de sérum de veau foetal (HyClone, Logan, UT, USA), glutamine à 1mM, et 1% d'acides aminés non essentiels. Les corps embryoïdes sont cultivés en suspension pendant 7 jours puis ensemencés sur un support gélatiné à 0,1%. Une observation quotidienne des corps embryoïdes permet de suivre l'apparition de zones battantes.

Induction des cellules

Les cellules hES sont soit traitées avec un mélange [BMP2 + SU5402] soit co-cultivées sur END-2.

2 jours après passage, les cellules sont incubées en présence du milieu de culture KO-DMEM sans FGF2 et supplémenté en mélange [BMP2 (10 ng/ml) (R&D Systems, Lille) + SU5402 (5 µM) (Calbiochem distribué par VWR, Fontenay sous bois)], pendant 48h avec renouvellement du milieu supplémenté en BMP2 et SU5402 à 24h.

Pour co-cultiver les cellules hES avec les END-2, les cellules hES sont passées sur des plaques 24 puits contenant soit des cellules nourricières STO soit des END2, mitomycinées. 24 heures après ensemencement, les cellules sont traitées ou non au BMP2 et au SU5402 comme précédemment.

Préparation et caractérisation des cultures organotypiques de tranches ventriculaires

Les cultures sont préparées à partir de sections ventriculaires de rats âgés de 3 jours (Charles River, France) ou d'embryons humains de 8 et 9,5 semaines. Les cœurs sont prélevés et placés en Phosphate-Buffered Saline (PBS), les oreillettes sont séparées des ventricules et les ventricules sont découpés en tranches de 1 mm d'épaisseur en utilisant une matrice de coeur de rongeur (Harvard Apparatus). Les tranches de coeur sont immédiatement transférées sur une membrane Millicell-CM de 0,4 µm (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines), elle-même placée dans un puits de plaque 6 puits contenant 1 ml de milieu (**figure MM2**). Le milieu de culture consiste en du milieu DMEM/F12 supplémenté en 20% de Knockout Serum Replacement (KSR), d'acides aminés non essentiels à 1%, de L-glutamine à 2 mmol/L, β-mercaptoéthanol à 0.1%, et de pénicilline/streptomycine à 0,1% (Invitrogen). Les tranches de

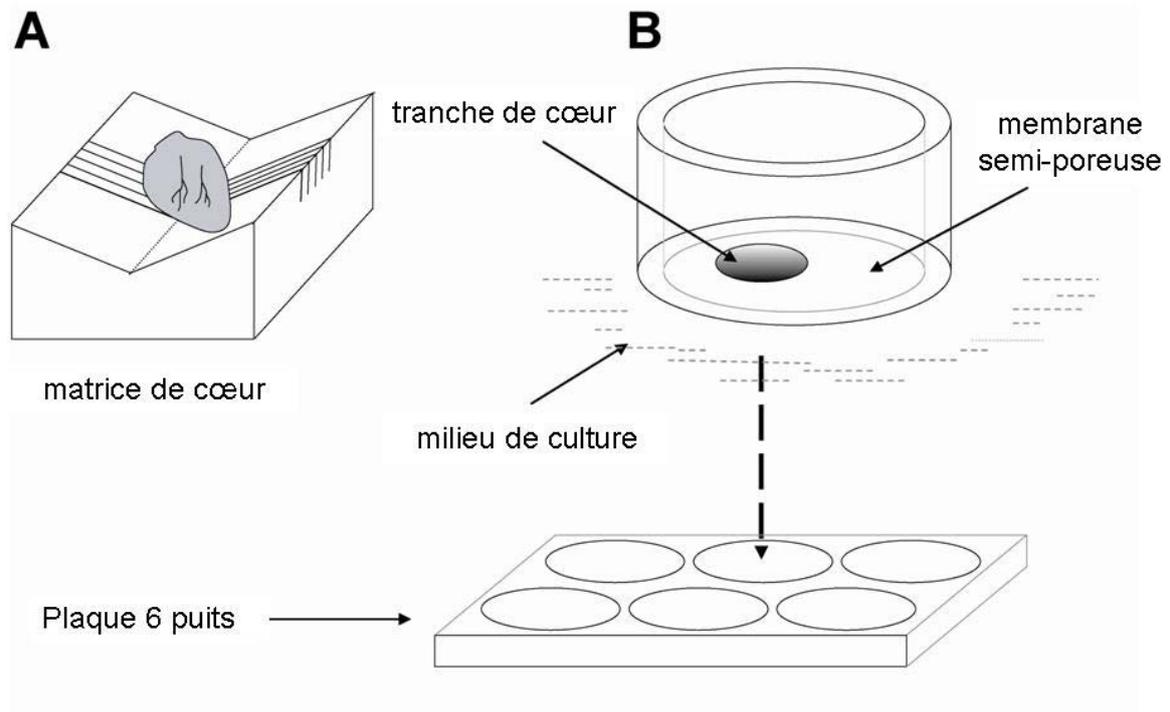


Figure MM2 : Représentation schématique de la préparation des tranches organotypiques de cœur

(A) les ventricules de rats néonataux sont placés sur une matrice de cœur et coupés en tranches de 1 mm d'épaisseur. (B) les tranches sont placées sur une membrane Millipore et cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂ pendant plus de deux mois.

coeur sont maintenues pendant 30-80 jours à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu est changé 3 fois par semaine.

Les tranches sont observées sous un microscope inversé tous les deux jours et leurs battements sont caractérisés en termes de fréquence, et de localisation des contractions les plus apparentes.

Une caractérisation fonctionnelle plus complète de l'activité contractile des tranches de ventricules a été réalisée sur 23 tranches, 30 jours après mise en culture, en utilisant un stéréomicroscope et en maintenant la température à 37°C, à la suite d'une incubation en présence de 10, 100 nmol/L et 1 µmol/L d'adrénaline (Sigma, France). La fréquence des battements a été suivie 3 minutes après la stimulation par l'agoniste.

Une analyse supplémentaire a été réalisée sur 3 tranches, 30 jours après mise en culture en utilisant un microscope confocal LSM510 (Zeiss, Le Pecq) à la suite d'une incubation en présence de fluo-4 AM à 5 µmol/L (Invitrogen) pendant 20 min à 37°C.

Implantation des cellules souches embryonnaires humaines dans les tranches

Les cellules hES SA01 et VUB01 ont été cultivées comme indiqué plus haut, et les cellules indifférenciées sont récoltées, et sont resuspendues dans du milieu utilisé pour les cultures organotypiques de tranches, à une densité de 1×10^5 cellules/µl. 0,1 µl de cette suspension est injecté dans les tranches en culture, en utilisant une seringue Hamilton de 0,5-µl fixée au bras d'un micromanipulateur. Le taux de contraction des tranches a été suivi par une observation quotidienne sous un stéréomicroscope Zeiss-LumarV12.

Culture des corps embryoïdes en bioréacteurs

Des cellules hES cultivées en flasque pendant 7 jours sont incubées en présence de 5 ml d'un mélange collagenase IV et Dispase I (à 1 et 0,3 mg/ml respectivement), pendant 20 minutes à 37°C, 5%CO₂. Les colonies de cellules hES se détachent des STO alors que celles-ci continuent d'adhérer à la flasque. Le milieu est aspiré, passé sur tamis de 100 µm pour éliminer les cellules nourricières présentes dans le milieu. Puis les colonies de cellules hES retenues sur le tamis sont récupérées, dissociées en petits agrégats et filtrées de nouveau sur un tamis de 70 µm, avant un contrôle visuel sous le microscope de la taille des agrégats. Les cellules hES sont ensemencées dans une chambre de bioréacteur à approximativement $0,5 \cdot 10^6$ cellules/ml, dans du milieu hES sans FGF2. Le bioréacteur est mis en rotation à 12 rpm, et la vitesse de rotation est augmentée quotidiennement d'1 rpm jusqu'à un plateau de 20 rpm. Le

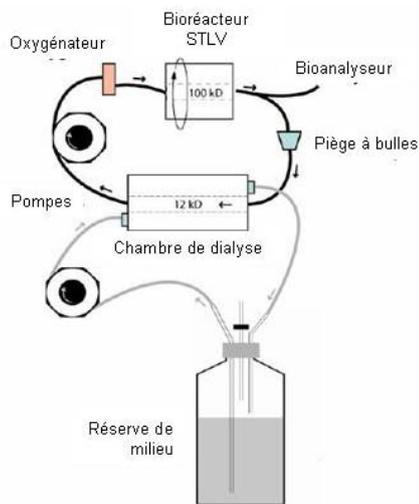


Figure MM3 : *diagramme du bioréacteur STLV perfusé/dialysé*

La boucle de dialyse (en gris) comprend la réserve de milieu, une pompe et l'extérieur de la chambre de dialyse équipée d'une membrane semi-perméable. La boucle de culture (en noir) comprend le bioréacteur STLV, une pompe, un oxygénateur, un piège à bulles, un bioanalyseur et l'intérieur de la chambre de dialyse. Seul le bioréacteur STLV tourne en continu.

flux de perfusion est établi pour renouveler tout le milieu de la chambre toutes les 24 heures (9 rpm). En contrôle, les cellules hES sont mises en suspension en boîtes de Pétri non traitées pour la culture, à la même concentration que dans les chambres de bioréacteur. Le milieu de ces boîtes est changé de moitié quotidiennement.

Mise en place et fonctionnement du bioréacteur

Le système de bioréacteur en STLV (Slow Turning Lateral Vessel) (**Figure MM3**) comprenant une chambre de 55 ml autoclavée, un moteur à vitesse variable conduit par des tachymètres (instrument de mesure de vitesse angulaire), un réservoir de milieu, une pompe péristaltique (provoque une constriction annulaire de caractère réflexe, qui se propage de haut en bas dans les organes tubulaires afin de faire progresser le contenu de ceux-ci) et un oxygénateur à membrane en silicone (Synthecon, Cellon SA, Bereldrange, Luxembourg). Tous les éléments sont reliés par des tuyaux flexibles en silicone. Les sorties de milieu de l'intérieur du cylindre du STLV sont protégées par une membrane de dialyse qui ne laisse passer que les composés de poids moléculaires de moins de 100 kDa, de façon à éviter la sortie des cellules. La seconde boucle consiste en une chambre de dialyse (200 ml) dont le cylindre intérieur est recouvert d'une membrane de dialyse ne laissant passer que les éléments de moins de 12kDa de poids moléculaire. La deuxième pompe produit un flux de milieu permettant le renouvellement complet du milieu en 24 heures. Une pompe à bulles a été ajoutée à la première boucle pour éviter un accident de pompe.

Les conditions de culture sont contrôlées en ligne par une connexion du Bioprofile 400 (Nova Biomedical, Les Ulis) au milieu usé à la sortie du bioréacteur STLV. L'analyse en ligne est réalisée toutes les 6 heures pour le pH, la pO_2 , la pCO_2 , l'osmolarité, la concentration en glutamine, glutamate, glucose, lactate, sodium, potassium et ammonium. L'analyseur est programmé en fonction des tests préliminaires, pour initier les cycles de calibration à intervalles réguliers de 4 heures. Une calibration manuelle et des contrôles qualités manuels ont été réalisés à chaque fois que cela a été jugé nécessaire. Les expériences préliminaires de contrôle ont confirmé que tous les paramètres physicochimiques pouvaient être maintenus stables au cours du temps dans la chambre de culture.

Les corps embryoïdes sont récupérés soit de la chambre du bioréacteur STLV soit des boîtes de Pétri à différents temps de la différenciation, pour être lysés et analysés par RT-PCR.

Amorces pour PCR	Séquence Forward	Séquence reverse
Non différencié		
OCT4	5'-GAGAACAATGAGAACCTTCAGGAGA-3'	5'-TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA-3'
Différenciation 3 feuillets		
alpha-actine cardiaque	5'-GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC-3'	5'-AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA-3'
Différenciation cardio précoce		
GATA4	5'-AGACATCGCACTGACTGAGAAC-3'	5'-GACGGGTCACTATCTGTGCAAC-3'
NKx2.5	5'-CTTCAAGCCAGAGGCCTACG-3'	5'-CCGCCCTCTGTCTTCTCAGC-3'
Différenciation cardio tardive		
cTnt	GGCAGCGGAAGAGGATGCTGAA	GAGGCACCAAGTTGGGCATGAACGA
ANF	GAACCAGAGGGGAGAGACAGAG	CCCTCAGCTTGCTTTTAGGAG
Alpha-actinine	GCGGTGCAGTACAACACTCGTG	AGTCAATGAGGTCAGGCCGGT
MLC2a	GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA	GCGAACATCTGCTCCACCTCA
MLC-2V	TATTGGAACATGGCCTCTGGAT	GGTGCTGAAGGCTGATTACGTT
Contrôle		
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACACC	GTA ^{CT} CAGCGGCCAGCATCG
Amorces pour PCR en temps réel	Séquence Forward	Séquence reverse
Non différencié		
OCT4	TTCTATTTGGGAAGGTATTCA CTT-GCT-GCA-GAA-GTG-GGT-GGA-GGA-A	CAGGTTGCCTCTCACTCGGTT CTG-CAG-TGT-GGG-TTT-CGG-GCA
Nanog	CAA-AGG-CAA-ACA-ACC-CAC-TT	TCT-GCT-GGA-GGC-TGA-GGT-AT
Différenciation 3 feuillets		
alpha-actine cardiaque	GCCCTGGATTTTGAAGTGA	GGCTGGAAGAGTGCTCAGG
Différenciation cardio précoce		
Isl1	CGCGTGGGACTGTGCTGAAC	TTGGGCTGCTGCTGCTGGAGT
GATA4	TCC-CTC-TTC-CCT-CCT-CAA-AT	TCA-GCG-TGT-AAA-GGC-ATC-TG
MEF2C	CGC-ATG-AGA-GCC-GGA-CAA-ACT	TGG-CTG-GAC-ACT-GGG-ATG-GAG
MLC2a	CGG-GGA-ACA-TCG-ACT-ACA-AG	TTT-CCA-ATT-TTG-CAA-CAG-AGT-TT
β-MHC	GGC-CCA-GAT-TCT-TCA-GGA-TT	TGG-CTG-GAC-ACT-GGG-ATG-GAG
Tbx6	TTCCGCTTCCCCGAGACCACATTC	GGGCCCCGAGTTTCTCTTCA
Différenciation cardio tardive		
alpha-actinine	CCAACCCCTACACAACCATC	TTGCGTAGCCTCTCATTGTG
ANP	TGT-TGC-CAT-GGA-GTT-GTG-AT	GAG-AGG-CGA-GGA-AGT-CAC-C
MLC2v	ACAGGGATGGCTTCATTGAC	CCCCAACATTGTGAGGAAC
Contrôle		
Ubiquitine C humaine	ATT-TGG-GTC-GCG-GTT-CTT-G	TGC-CTT-GAC-ATT-CTC-GAT-GGT
Ubiquitine C de rat	TCG-TAC-CTT-TCT-CAC-CAC-AGT-ATC-TAG	GAA-AAC-TAA-GAC-ACC-TCC-CCA-TCA

Tableau MMT1 : Séquences des couples d'amorces pour les PCR et PCR en temps réel

Les séquences en bleu sont celles qui ont été utilisées pour les Q-PCR sur le matériel issu des tranches.

Analyse de l'expression des gènes

Les profils d'expression de plusieurs marqueurs cardiaques ont été analysés par RT-PCR à partir des ARN des cellules à différents temps de la différenciation, et à partir d'ARN extraits des cultures de tranches. Pour les cellules en différenciation, les ARN ont été extraits en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen, Courtaboeuf) en respectant les instructions du fabricant. Les ARN totaux des tranches ont été extraits à partir des cultures de tranches en utilisant le réactif au TRIZOL (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Les ADNc ont été synthétisés à partir des ARN totaux en utilisant la SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Les ADNc sont amplifiés par PCR dans un volume réactionnel contenant du tampon 10X, des déoxynucléosides triphosphate à 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, amorces (voir **tableau MMT 1**) 0,5 μM et 0,2 U de Taq Polymérase (Invitrogen).

Les ADNc sont amplifiés par PCR quantitative en utilisant le Système BIORAD Chromo4 et le Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, USA) ou le système Light Cycler (Roche Diagnostic) en utilisant SYBR Green I master (Roche, Fontenay) pour l'analyse de l'expression des marqueurs cardiaques humains. Les couples d'amorces sont présentés dans le **tableau MMT1**. Le processus d'amplification par PCR inclut une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 15s et une étape d'appariement-extension à 60-65°C pendant 40s. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'extension. Les courbes de température de fusion permettent d'identifier la spécificité des produits de PCR, qui sont vérifiés par migration sur gel d'électrophorèse. Les résultats sont normalisés par l'expression de l'ubiquitine humaine, et l'ubiquitine de rat a été utilisée comme contrôle interne supplémentaire pour les Q-PCR réalisées sur le matériel issu des tranches. La quantification de l'expression des ARN messagers est basée sur une valeur de Ct (Cycle threshold) calculée par le logiciel Opticon Monitor.

Passage des cellules au FACS

Les corps embryoïdes sont prélevés à différents temps de la différenciation et centrifugés à 900 rpm pendant 3 min. Le culot est traité avec 1 ml de trypsine (Invitrogen) à 37°C, 5% CO₂ pendant 5 minutes. Les cellules sont dissociées au cône jaune puis filtrées sur un tamis de 40 μm. 5 ml de PBS-BSA 1% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier) sont ajoutés au filtrat pendant que les cellules restées sur le tamis repartent pour un nouveau cycle d'incubation avec la trypsine, dissociation, filtration. Le filtrat rejoint le premier, avec un ajout de PBS-BSA 1%. Les cellules sont ensuite lavées deux fois en PBS-BSA 1%, puis distribuées dans les

tubes FACS pour subir l'incubation avec les différents anticorps, 20 minutes à température ambiante. Les anticorps utilisés sont les anticorps monoclonaux de souris anti-VEGF-R2/KDR-PE (couplé à la phycoerythrine, PE) et son isotype contrôle, l'IgG-PE ; l'anti-CXCR4-APC (Allophycocyanine) et son isotype contrôle, IgG2b-APC ; et l'anticorps polyclonal de chèvre l'anti-cadherine-E biotinylé et son isotype contrôle, IgG de chèvre biotinylée (tous de R&D Systems). Pour marquer les anticorps anti-Cadherine biotinylés, les tubes sont incubés après lavages avec la streptavidine-PECy7 pendant 15 minutes à 4°C avant passage au FACS (FACSCalibur, Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix).

Analyses immunohistochimiques

A différents temps, les tranches de ventricules ont été fixées pour des marquages histologiques et immunologiques. Les tranches de cœur fixées dans du paraformaldehyde à 4% pendant 2 heures à 4°C ont été coupées en sections de 10µm d'épaisseur. Les cryosections ont été lavées 3 fois avec du PBS puis incubées 1h à température ambiante dans une solution de saturation qui contient 5% de sérum normal de chèvre, 5% de sérum normal de cheval et 0,6% de Triton X-100 dans du PBS (Sigma-Aldrich). Les tranches ont été incubées sur la nuit avec les solutions d'anticorps primaires utilisés au 1/400 : les anticorps monoclonaux de souris anti-noyaux humains (HNA, Chemicon Saint-Quentin en Yvelines), anti-connexine 43 (CX43, Chemicon), anti-CD31 de rat (BD Pharmigen), anti-desmine (Chemicon), anti- α -actinin humaine (Chemicon) et l'anticorps polyclonal de lapin anti troponine I (cTnI, Chemicon). Après 3 lavages avec du PBS, les tranches ont été incubées avec une solution d'anticorps secondaires couplés au 1/500 pendant 1h à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : Alexa-Fluor 488 chèvre anti-lapin IgG et Alexa-Fluor 555 chèvre anti-souris IgG (Molecular Probes, Invitrogen). Après 3 lavages, les tranches ont été lavées avec un solution de DAPI au 1/10000. Puis les tranches ont été montées en utilisant le Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA). Les tranches ont été ensuite observées sous un microscope à épifluorescence (Zeiss Imager Z1) et les images ont été acquises en utilisant le logiciel Axio-vision.

Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant des tests ANOVA et de Student. Une valeur de $p \leq 0.05$ était considérée comme statistiquement significative.

Discussion

Le résultat principal de cette étude est l'obtention d'un outil puissant pour étudier la thérapie expérimentale du cœur.

Cela a été possible en élaborant un modèle de culture organotypique de cœur sur lequel peuvent être réalisées des études pharmacologiques et de transplantation sur le long terme. Ces cultures organotypiques de tranches de ventricules présentent non seulement une histologie préservée pendant plus de 3 mois, mais aussi des ondes calciques associées à des battements réguliers et modulables par traitement à l'adrénaline. Ce modèle *in vitro* est le premier qui offre la possibilité de tester la différenciation en cardiomyocytes de cellules hES après implantation dans le tissu cardiaque. Cela représente un outil d'étude pour suivre le devenir de progéniteurs cardiaques dérivés à partir de cellules hES.

Par ailleurs nous avons différencié deux lignées de cellules hES en cardiomyocytes. Les protocoles élaborés par la suite ont montré que les cellules hES traitées par le BMP2 montraient un engagement significatif dans la voie cardiaque, et que la culture en bioréacteur produisait des populations de corps embryoides plus homogènes que celles obtenues en culture statique.

Un modèle de culture organotypique

Un modèle histologiquement et fonctionnellement préservé.

Les premières cultures organotypiques de tranches d'hippocampe ont offert un outil efficace pour les études neurologiques (Stoppini, Buchs et al. 1991). Les cultures de tranches de cerveau ont servi plus tard comme tissu hôte pour l'implantation de cellules de gliome pour des analyses quantitatives de l'invasion des cellules gliomales (de Bouard, Christov et al. 2002). Ces résultats ont ouvert la possibilité d'envisager un mode de culture *ex vivo* pour des études fonctionnelles sur organe sans la contrainte des études *in vivo*. En ce qui concerne le cœur, les modèles organotypiques mentionnés par Partridge dans une revue récente consistent en des systèmes compliqués d'organe perfusé ou de bandes de tissus mises en culture, et des tranches de cœur conservées à court terme (Partridge 2006) (Ott, Matthiesen et al. 2008). Ces modèles ont été mis en place dans le cadre d'études pharmacologiques pour répondre à un besoin de conserver la structure tissulaire afin de rendre compte de la complexité de l'organisation structurale du cœur. En effet, la fonction cardiaque dépend de la structure du tissu, caractérisée par des cardiomyocytes alignés, présentant des sarcomères organisés et exprimant des protéines de jonction. Ces protéines doivent présenter une distribution

membranaire et doivent être partagées avec les cellules avoisinantes et ainsi indiquer que les communications intercellulaires sont possibles. L'intégrité du tissu tient aussi compte des cellules non myogéniques et de la matrice extracellulaire qui doivent être préservées. (Halbach, Pillekamp et al. 2006).

En 2005, Pillekamp et collaborateurs ont mis au point des tranches de cœur embryonnaire de souris permettant des études électrophysiologiques. Mais la nature immature du tissu embryonnaire ne pouvait rendre compte des caractéristiques structurales du myocarde adulte ainsi que de ses propriétés électrophysiologiques (Pillekamp, Reppel et al. 2005). Récemment, Halbach et collaborateurs ont développé un modèle de tranches de cœur adulte murin qui offrait un support dont la structure tissulaire était préservée (Halbach, Pillekamp et al. 2006). Les tranches obtenues pouvaient battre sous stimulation mais aussi de manière spontanée, sans que ces contractions ne persistent au cours du temps de culture assez court (quelques heures). Les tranches que nous avons obtenues ont montré une propension à battre spontanément en culture pendant plus de 100 jours et constituent ainsi un modèle d'études fonctionnelles à long terme.

Un des paramètres qui a pu permettre ce maintien sur le long terme est vraisemblablement le modèle de culture en lui-même, à savoir sur des membranes semi-poreuses, à l'interface air-milieu. En effet, au regard des résultats de Pillekamp (Gandolfi, Brendel et al. 1995; Pillekamp, Reppel et al. 2005; Pillekamp, Reppel et al. 2006; Pillekamp, Reppel et al. 2007), qui font état d'une perte d'activité du réseau au bout de 3-4 jours, et en comparant les données de la littérature fournie sur les tranches de cerveau, nous avons présumé que le fait d'immerger les tranches de cœur expliquait que ces tranches n'étaient pas préservées au cours du temps. La préservation sur le long terme de tranches organotypiques de cerveau a été obtenue en remplaçant l'immersion par des techniques qui permettaient une oxygénation directe des tranches, soit en utilisant une rotation lente pour permettre un échange à l'interface liquide-gaz (Gahwiler, Capogna et al. 1997), soit en plaçant les tranches à l'interface air-milieu sur des membranes semi-poreuses (Stoppini, Duport et al. 1997). Nous avons choisi d'adapter cette dernière technique car elle était compatible avec une implantation de cellules par la suite (de Bouard, Christov et al. 2002; Oliveira, Christov et al. 2005).

Nos résultats confirment la préservation sur le long terme des tranches organotypiques également pour le cœur dans ces conditions d'interface air-milieu. Il est intéressant de souligner que ces conditions de préservation ne concernent pas uniquement les cellules isolées

mais aussi les structures pluricellulaires formées dans le tissu, comme le montrent à la fois l'alignement des cardiomyocytes reliés par des jonctions communicantes, la préservation des connexines localisées à la membrane, tout comme la présence d'un réseau dense de capillaires (même en absence de sang), mais aussi la démonstration que les oscillations calciques peuvent se propager au sein des régions de la tranche contenant des cardiomyocytes excitables. Tout cela vient renforcer encore la liste des arguments démontrant la préservation tissulaire et fonctionnelle des tranches.

Les tranches se sont révélées capables de répondre à l'ajout de drogues chronotropes dans le milieu de culture, prouvant ainsi qu'elles ne sont pas inertes mais réceptives aux modifications du milieu extérieur. L'avantage rencontré avec ce modèle de tranche est celui d'une évaluation du potentiel d'un agent pharmacologique qui peut être réalisée par une exposition de longue durée (Partridge, Johnson et al. 2005). De plus, les méthodes d'analyse de la réponse du tissu sont faciles à mettre en place, les résultats sont vite obtenus et facilement interprétables, ce qui représente un avantage supplémentaire à d'autres modèles organotypiques tels que l'organe perfusé (Partridge, Johnson et al. 2005).

De récents travaux de Caspi et collaborateurs montrent que des cardiomyocytes dérivés de cellules hES peuvent être utilisés pour tester l'effet de drogues anti-arythmiques (Caspi, Itzhaki et al. 2008). Les cardiomyocytes ainsi utilisés, en combinaison avec la technologie des Microelectrode Arrays (EMA) constituent un nouveau modèle *in vitro* qui vient s'ajouter à la courte liste de ceux déjà existants. Les auteurs soulèvent toutefois quelques limitations dues à la nature de leur modèle : 1) les cardiomyocytes dérivés des cellules hES ne sont pas totalement matures. Ils expriment des canaux ioniques, mais leur phénotype moléculaire, structural et électrophysiologique n'est pas celui de cardiomyocytes ventriculaires adultes. 2) le matériel utilisé n'est pas homogène et contient des cellules non cardiaques, parfois encore proches de l'état indifférencié, des cellules atriales et ventriculaires. 3) enfin, le modèle ne reflète pas les organisations complexes qui existent entre des cellules hétérogènes au sein de la paroi ventriculaire, ni l'organisation tridimensionnelle de l'organe (Caspi, Itzhaki et al. 2008).

Ainsi, notre modèle de culture organotypique de tranche de cœur remplit tous ces critères et permet d'envisager non seulement le test de drogues sur les tranches seules mais aussi de tester les propriétés de conduction des cardiomyocytes dérivés des cellules hES *in vitro* ou après injection dans les tranches.

Un modèle d'étude de la transplantation de cellules hES

Nous avons pu tester l'injection de cellules hES indifférenciées dans ces tranches. Après deux mois de culture, les cellules sont retrouvées et expriment différents marqueurs cardiaques, prouvant ainsi que les cellules sont capables de trouver *in situ* les facteurs permettant la différenciation cardiaque. Des essais de transplantation de cellules hES indifférenciées dans des cœurs sains et ischémiés montrent qu'aucune cellule cardiaque n'est retrouvée (Leor, Gerecht-Nir et al. 2007; Caspi, Itzhaki et al. 2008). Les auteurs suggèrent donc que l'environnement cardiaque seul ne suffit pas à guider les cellules (Caspi, Huber et al. 2007; Leor, Gerecht-Nir et al. 2007) et ont préféré injecter des cardiomyocytes différenciés. Or, les cellules hES indifférenciées que nous avons injectées sont positives pour l'expression de plusieurs marqueurs cardiaques deux mois après injection. Ces cellules ont été cultivées en absence de sérum et de facteurs favorisant l'engagement cardiaque. Nous pouvons donc conclure que les signaux induisant la différenciation cardiaque provenaient du parenchyme des tranches de cœur, facteurs que l'on imagine sécrétés en conséquence du stress induit par les coupes lors de la préparation. Cependant, les cellules retrouvées ne sont pas totalement matures, notamment parce qu'elles présentent toujours une activité prolifératrice. Nous pouvons toutefois présumer qu'en injectant des progéniteurs cardiaques, ceux-ci trouveraient les facteurs trophiques nécessaires au sein de la tranche pour poursuivre leur différenciation.

Récemment, des tranches de cœurs de rats néo-nataux ont été développées de façon à reproduire une situation d'ischémie. Des cardiomyocytes dérivés de cellules hES ont été disséqués de zones battantes et greffés à la surface de ces tranches (Pillekamp, Reppel et al. 2007; Hannes, Halbach et al. 2008). Entre 4 et 7 jours, les auteurs rapportent une intégration mécanique des cellules greffées, mise évidence par la visualisation d'interactions structurales entre les cardiomyocytes dérivés des cellules hES et la matrice, et provoquant ainsi des mouvements de contractions spontanés de toute la préparation. Ces études diffèrent des nôtres sur plusieurs points : non seulement il s'agit de cellules déjà différenciées en cardiomyocytes battants mais aussi d'études sur le court terme (une semaine). Ces études nous suggèrent déjà que les cellules greffées peuvent s'intégrer avec les cellules de la tranche. Ce modèle pathologique du cœur ischémié suggère que l'utilisation de cultures organotypiques de tranches de cœurs atteints d'une pathologie proche de la cardiomyopathie associée à DMD permettrait de reproduire les facteurs éventuellement présents dans cet environnement.

Par ailleurs, même après deux mois de culture organotypique, les cellules font encore preuve de prolifération, comme l'indique le marquage au Ki67. Cui et collaborateurs ont constaté que les cardiomyocytes cultivés *in vitro* continuent de proliférer. Cependant, deux mois après greffe de cardiomyocytes dans des sites extracardiaques, les auteurs ne trouvent plus ce potentiel de prolifération dans les cellules injectées (Cui, Johkura et al. 2007). Nous avons observé une activité prolifératrice des cellules injectées après 2 mois de culture dans les tranches de cœur de rat, il semblerait donc que l'environnement cardiaque n'est pas incompatible avec la prolifération des cellules injectées. Plus précisément, Caspi et collaborateurs retrouvent 10% de cardiomyocytes prolifératifs 36h après implantation cardiaque de cardiomyocytes microdisséqués, mais ne retrouvent pas cette activité un mois après la greffe (Caspi, Huber et al. 2007). En revanche, Laflamme et collaborateurs ont retrouvé une activité prolifératrice dans 1% des cardiomyocytes 4 semaines après transplantation d'une population enrichie en cardiomyocytes dérivés de cellules hES (Laflamme, Chen et al. 2007). Le potentiel prolifératif serait alors dépendant du stade d'avancement dans la différenciation cardiaque des cellules greffées. En effet, les cellules présentes dans les zones disséquées utilisées par Caspi et collaborateurs sont négatives pour les marqueurs d'indifférenciation et 71% d'entre elles sont positives pour la troponine I cardiaque (Caspi, Huber et al. 2007), alors que la population cellulaire obtenue après enrichissement par un gradient de Percoll (Laflamme, Chen et al. 2007) présente 15% de cardiomyocytes. Cela suppose que les cellules que nous retrouvons dans les cœurs après deux mois de culture sont encore immatures. Cependant, il faut rappeler que les cellules injectées pour tester la faisabilité de l'implantation étaient des cellules indifférenciées sans traitement préalable pour initier la différenciation cardiaque et que les tranches proviennent de cœurs sains, indiquant encore une fois le besoin de modèle pathologique.

La caractérisation des cellules greffées a permis de retrouver des cardiomyocytes humains dans les tranches. Les essais de transplantation de cardiomyocytes dans des cœurs ischémiés de rat montrent que certains cardiomyocytes greffés présentent un degré de maturation avancé proche de ce que l'on retrouve à la naissance (Dai, Field et al. 2007). Ce degré de maturité est reflété par l'organisation sarcomérique (Caspi, Huber et al. 2007; Dai, Field et al. 2007; Laflamme, Chen et al. 2007; Leor, Gerecht-Nir et al. 2007), ainsi qu'une répartition membranaire de la connexine 43 plutôt que cytoplasmique dans les cardiomyocytes immatures (Caspi, Huber et al. 2007; Dai, Field et al. 2007). Dans certains cas, ces cardiomyocytes matures ont été observés juxtaposés aux cellules du myocarde hôte, avec de

rare connexions *via* la connexine 43 (Caspi, Huber et al. 2007; Cui, Johkura et al. 2007; Dai, Field et al. 2007). Tomescot et collaborateurs ne retrouvent pas un tel marquage, après greffe de cellules hES traitées 48h en présence de BMP2 et SU5402 (Tomescot, Leschik et al. 2007). Il apparaît donc que les cellules injectées dans les tranches n'ont pas atteint un stade de différenciation suffisamment avancé pour exprimer la connexine 43 à la membrane et donc établir un couplage électromécanique avec les cellules hôtes. Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène implique un effet d'espèce. Les études sur les tranches de cœur humain apporteront peut-être un moyen d'y répondre. Les cellules différenciées *in vitro* sont capables d'exprimer cette protéine de communication (Kehat, Khimovich et al. 2004; Cui, Johkura et al. 2007), alors qu'*in vivo* cette expression est certes retrouvée mais moins massivement : Dai et collaborateurs retrouvent dans 25% du tissu qui compose la bordure myocarde/greffe des cardiomyocytes avec une expression discrète de connexine 43 partagée entre les cellules hôtes et greffées (Dai, Field et al. 2007). Le profil d'expression de la connexine observé dans les travaux rapportés par Caspi et collaborateurs est similaire (Caspi, Huber et al. 2007). Les tranches constituent donc un bon modèle pour étudier ces différences observées dans l'expression de la connexine 43 *in vitro* et *in vivo*.

La culture en bioréacteur

Nous avons montré que la culture en bioréacteur permettait une homogénéisation morphologique des corps embryoïdes produits par ce procédé. Nous avons retrouvé les résultats décrits par les travaux d'Itskovitz-Eldor qui, en 2004, démontrent que l'utilisation d'un bioréacteur STLV favorise la formation de corps embryoïdes par rapport à la formation des corps embryoïdes en boîte (Gerecht-Nir, Cohen et al. 2004). Cette efficacité concerne la taille, la structure des corps embryoïdes, la survie des cellules et leur potentiel de dérivation dans les trois feuilletts embryonnaires (Gerecht-Nir, Cohen et al. 2004).

La culture en bioréacteur présente l'avantage de pouvoir s'adresser à un nombre significatif de cellules et de s'affranchir de l'utilisation de cellules nourricières pour la différenciation. On se rapproche ainsi des conditions requises pour une application en clinique. L'accès aux facteurs physicochimiques du milieu permet aussi de maîtriser les conditions de culture dans une optique de standardisation (Hammond and Hammond 2001; Schroeder, Niebruegge et al. 2005; Niebruegge, Nehring et al. 2008).

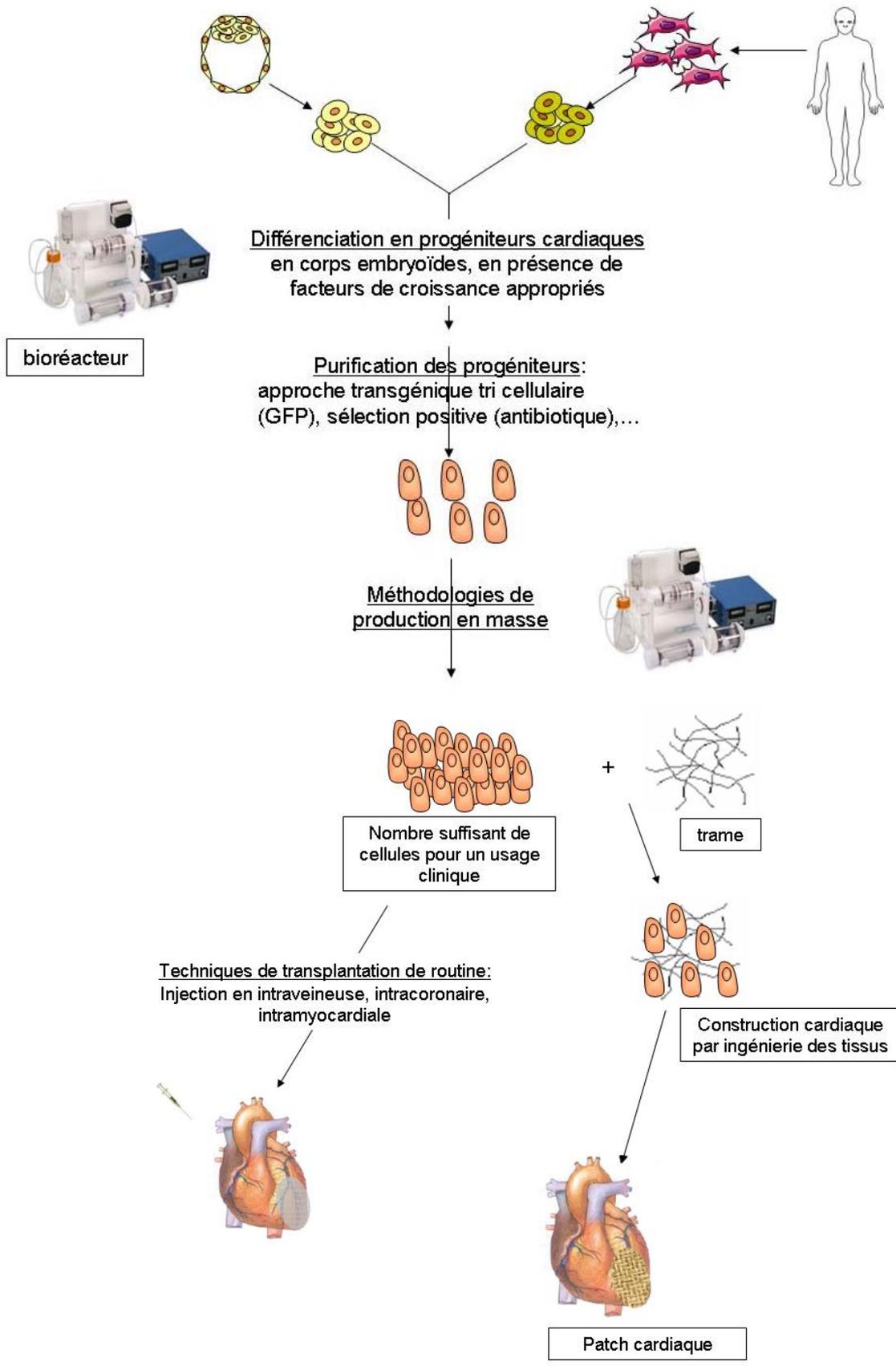
Ainsi, la culture en microgravité offre la possibilité de préserver un microenvironnement autour des cellules agrégées en corps embryoïdes en évitant la sédimentation de particules à

travers le milieu de culture (Hammond and Hammond 2001). Les nutriments sont aussi souvent plus disponibles du fait à la fois du flux de milieu et du mouvement des cellules (Hammond and Hammond 2001).

Les bioréacteurs STLV présentent un avantage supplémentaire par rapport à d'autres modes de culture en gravité, car les forces de cisaillement, qui peuvent causer la déstructuration des corps embryoïdes, sont limitées (Hammond and Hammond 2001). De même, le taux de collision entre les corps embryoïdes est aussi moindre, ce qui évite les agglomérations entre corps embryoïdes (Cameron, Hu et al. 2006). Ce paramètre n'est pas négligeable puisque Dang et collaborateurs ont rapporté que ce phénomène peut causer des désorganisations des corps embryoïdes et ainsi perturber la différenciation des cellules à l'intérieur des corps embryoïdes (Dang, Gerech-Nir et al. 2004; Niebruegge, Nehring et al. 2008).

Nous avons vu, au niveau de la différenciation cardiaque, que les marqueurs tardifs non exprimés dans les corps embryoïdes en boîte de Pétri étaient détectés dans les corps embryoïdes en bioréacteur, au même stade (8 jours). L'homogénéité de la population issue des bioréacteurs n'est pas la seule explication à ce résultat. En effet, la culture en microgravité semble permettre une meilleure différenciation, notamment par les paramètres de taille et de densité des structures formées (Schroeder, Niebruegge et al. 2005).

Il est établi que les corps embryoïdes miment le stade 3 feuillet de l'embryon (Pera and Trounson 2004), ainsi, les cellules engagées dans la voie cardiaque reçoivent des signaux de cellules de type endoderme avoisinantes. Conley et collaborateurs ont d'ailleurs montré que les corps embryoïdes contenaient des cellules montrant des caractéristiques des cellules de l'endoderme viscéral, inductrices de la différenciation cardiaque dans l'embryon (Conley, Trounson et al. 2004). Ces phénomènes d'induction sont valables dans la situation de culture statique mais certaines restructurations morphologiques peuvent gêner ces processus. En effet, nous avons vu que ces corps embryoïdes présentaient des zones « caviteuses » communément observées (Cameron, Hu et al. 2006). Ainsi, dans les STLV, où les corps embryoïdes n'apparaissent pas former ces structures, la différenciation suit une cinétique proche de celle observée *in vivo* et les marqueurs de différenciation avancée apparaissent plus tôt que dans les cellules cultivées en boîte de Pétri. Cette idée est renforcée par l'observation que Nanog n'est plus retrouvé exprimé dans les corps embryoïdes en STLV. Cette absence de marqueur d'indifférenciation indique de plus que l'on peut raisonnablement envisager que les cellules issues de ces corps embryoïdes peuvent être utilisées pour une thérapie cellulaire avec un risque très faible de formation de tératome.



Cependant, les corps embryoïdes, parce qu'ils contiennent des cellules dérivées des 3 feuillets, ne peuvent être utilisés tels quels pour une transplantation cardiaque. Il faut alors prévoir d'initier la différenciation cardiaque en agréant les cellules en bioréacteur avant de procéder à un tri des cellules à injecter ou encore de combiner ce type de culture avec un traitement par des facteurs trophiques. Dans cette idée, Niebruegge et collaborateurs ont imaginé un système pour sélectionner la croissance de cardiomyocytes après une phase d'amplification. Le processus utilise la culture en bioréacteurs renforcée par un système de perfusion, pour optimiser les conditions de croissance et différenciation, combinée à une stratégie d'induction de la différenciation par ajout d'acide rétinoïque, en utilisant des cellules génétiquement modifiées pour promouvoir la survie des cellules engagées dans la voie cardiaque (Niebruegge, Nehring et al. 2008). Ce système développé à partir de cellules ES de souris conforte notre volonté d'utiliser les bioréacteurs associés à l'induction par des facteurs de croissance sur des cellules hES pour obtenir des progéniteurs cardiaques en population homogène à des fins d'application thérapeutique. On pourra imaginer un processus tel que représenté dans le schéma ci-contre partant de cellules pluripotentes (hES ou iPS), desquelles sont dérivées des cellules cardiaques ou progénitrices cardiaques, qui associées à des procédés tels que les bioréacteurs et l'ingénierie des tissus pourront être injectées chez des patients.

Conclusion-Perspectives

Les efforts concentrés au moment du démarrage de ma thèse sur l'optimisation des protocoles d'obtention de cardiomyocytes se sont aujourd'hui focalisés sur la recherche de progéniteurs cardiaques qui permettraient, une fois injectés, de reconstituer du tissu cardiaque comprenant des cardiomyocytes mais aussi de quoi reconstituer une vascularisation locale. Le modèle de culture organotypique de tranche de cœur que nous avons développé permettra de tester les populations de progéniteurs. Ainsi, ayant validé la fonctionnalité et la préservation des tranches sur le long terme, et ce pour deux espèces, la prochaine étape s'adressera aux modèles pathologiques. Pour repousser ou contourner les limites du modèle de culture organotypique, nous souhaitons améliorer le suivi de la différenciation des cellules injectées, ainsi que leur intégration. Ce dernier point passera notamment par un travail sur la connexine 43, élément clef de la communication des cellules cardiaques. Les efforts seront moins prononcés sur les ressources biologiques mais le travail sera poursuivi sur la recherche de progéniteurs à travers une induction de voies de signalisation pour engager les cellules, en s'appuyant sur les travaux récemment publiés sur l'obtention de progéniteurs KDR⁺ (Yang, Soonpaa et al. 2008) qui font échos aux expériences menées en fin de thèse, car ils combinent le tri de cellules à des temps donnés au traitement des cellules avec les facteurs trophiques décrits à des temps et durées précis. De même, le travail de Michel Pucéat (Leschik, Stefanovic et al. 2008) décrit une nouvelle méthode d'isolation de progéniteurs et apporte ainsi des avancées dans la quête de cellules progénitrices aujourd'hui mieux pressenties pour l'utilisation en thérapie que des cardiomyocytes différenciés.

1) la modélisation pathologique

Nous avons appliqué le modèle élaboré chez le rat à l'homme et avons observé sur les premières tranches de cœur humaines que nous retrouvions les caractéristiques fonctionnelles et de préservation tissulaires sur le long terme. L'étape suivante consiste donc à établir des tranches de cœur pathologiques. Nous envisageons pour cela le modèle du hamster CHF147 qui présente une cardiopathie. Cependant, la faible disponibilité et la fragilité des animaux atteints nous amènent aussi à considérer le modèle de souris *mdx* double KO pour la dystrophine et l'utrophine, qui présente une atteinte cardiaque plus prononcée que la souris *mdx* (Deconinck, Rafael et al. 1997; Grady, Teng et al. 1997).

De récents travaux rapportent qu'une altération de la dystrophine, en plus de fragiliser la membrane et le cytosquelette, a un impact sur les canaux ioniques et des cascades de signalisation qui en dépendent (Friedrich, von Wegner et al. 2008). Le calcium intracellulaire se trouve ainsi directement impliqué dans les conséquences de ce phénomène. De ce fait,

même si la souris *mdx* ne présente pas les atteintes cardiaques, ou même le hamster CHF147, dont la pathologie ne concerne pas la dystrophine mais une sorte de sarcoglycanopathie, ces deux animaux représentent des modèles pathologiques utiles pour l'étude de cet aspect microscopique de l'atteinte.

Dans le cas de cœurs atteints, nous devons suivre attentivement au niveau macroscopique et microscopique la constitution du tissu. En effet, aura-t-on une détérioration du parenchyme s'accompagnant de fibrose, autrement dit, l'atteinte cardiaque évoluera-t-elle dans les cultures organotypiques ? Ou devra-t-on établir des cultures à différents stades d'avancement de la pathologie ?

En parallèle de ces travaux sur la modélisation pathologique, nous développerons des travaux sur le devenir des cellules injectées grâce au modèle de culture organotypique établi.

2) Améliorer le suivi de la différenciation des cellules injectées

Nous avons montré que les cellules injectées se différenciaient dans la voie cardiaque et exprimaient des marqueurs tardifs de la différenciation *via* des techniques utilisées qui renseignent sur la présence de marqueurs intracellulaires. Déterminer le profil électrophysiologique apporterait des informations complémentaires et permettrait de mieux définir « l'âge » des cellules dans la différenciation (embryonnaires, fœtales, néo-natales ou adultes).

De plus, le cœur renferme différents types cellulaires (cellules de muscle lisse, cellules endothéliales) qui présenteront autant de profils électrophysiologiques différents.

L'obstacle auquel nous avons été confrontés est de pouvoir repérer les cellules greffées, il pourra être contourné à l'avenir par le biais de cellules modifiées. Suivre le devenir des cellules greffées consiste aussi à étudier leur intégration dans le tissu et avec les cellules hôtes.

3) Suivi de l'intégration des cellules injectées

Nous avons vu que les cellules injectées restaient proches du point d'injection et les mouvements observés semblaient se limiter à suivre les capillaires. Les cellules semblent se créer une place dans le syncytium.

Pour connaître plus précisément les relations avec les cellules voisines, le travail s'envisage sur deux aspects :

- suivre le flux calcique entre cellules hôtes et cellules greffées. Cela nécessite à nouveau de pouvoir repérer les cellules greffées et de jouer avec plusieurs marqueurs fluorescents : pour les cellules hôtes, les cellules greffées et le marqueur lié au Ca^{2+} , tout en tenant compte d'éventuels phénomènes de bleaching, quenching, etc.
- étudier les connexines 43. De nombreux travaux d'injection des cellules ES dans le cœur présentent des jonctions communicantes entre cellules hôtes et cellules greffées par le biais d'un marquage dirigé contre la Connexine 43 (Caspi, Huber et al. 2007; Cui, Johkura et al. 2007; Dai, Field et al. 2007). Cependant il s'agit d'un évènement rare.

Une récente étude a montré que l'intégration des cellules était directement liée à l'expression de connexine 43 (Roell, Lewalter et al. 2007). En effet, les auteurs de cette étude ont utilisé des myoblastes issus de souris transgéniques exprimant la connexine 43 sous le contrôle d'un promoteur de gène de muscle squelettique. Les cellules ainsi greffées dans le cœur se sont montrées capables de former des jonctions communicantes, alors que cela n'est jamais observé dans le cas de greffe de myoblastes dans le cœur. Ces jonctions sont fonctionnelles puisque un marqueur fluorescent a pu être transféré (Roell, Lewalter et al. 2007).

Ainsi, la clé de l'intégration résiderait dans l'expression de la connexine 43 à la surface des cellules injectées, de manière organisée en connexons fonctionnels. Pour cela, des études sur le métabolisme de la connexine 43 montrent que son taux de renouvellement à la membrane est très élevé et qu'elle est sujette à de multiples phosphorylations. Plusieurs sites de phosphorylation sont concernés (sérines, tyrosines localisées majoritairement dans la partie C-terminale de la protéine) et plusieurs kinases sont impliquées. Le rôle des phosphorylations n'est pas élucidé mais il apparaît que cela influe sur la présence des protéines et/ou fonctionnalité à la membrane, en réponse à des processus liés au cycle cellulaire ou induits par un stress tel qu'une ischémie (pour revues, Laird 2005; Solan and Lampe 2005; Rodriguez-Sinovas, Cabestrero et al. 2007).

Des études sur l'expression de la connexine 43 des différents tissus adultes et embryonnaires suggèrent que la connexine 43 aurait un rôle dans le développement, le déterminisme cellulaire, le contrôle de la croissance mais aussi la progression de tumeurs (King and Lampe 2005). Les différentes formes de phosphorylation de la connexine 43 ne sont pas toutes élucidées. Mieux comprendre les mécanismes de phosphorylation, et de fait les interactions protéiques et leurs conséquences, permettrait de mieux se rendre compte des processus biologiques impliquant les connexines qui se révéleront peut-être plus nombreux et variés que

ceux que l'on connaît actuellement. En ce qui concerne le tissu cardiaque, il nous paraît important de connaître l'implication de la connexine 43 et de ses différentes formes phosphorylées au cours du développement, ainsi qu'à la suite d'une lésion, au niveau de son métabolisme cellulaire et de son adressage à la membrane. On peut imaginer que par la suite, on pourra jouer sur son expression et/ou son niveau de phosphorylation pour favoriser la différenciation mais aussi l'intégration des cellules greffées.

Bien sûr le chemin à parcourir jusqu'à la clinique est encore long pour les dérivés de cellules hES en général, puisqu'il faut, entre autres, adapter les cultures aux conditions et à l'échelle des Bonnes Pratiques de Fabrication. Les travaux de Niebruegge et collaborateurs apportent un élément de réponse au problème en calculant le rapport de cardiomyocytes obtenus par volume de milieu, apportant ainsi une notion de coût en plus de résultats d'optimisation (Niebruegge, Nehring et al. 2008). L'autre aspect à prendre en compte sera d'établir et respecter un consensus international de la réglementation encadrant l'utilisation des cellules hES en clinique (Rao 2008), et sur les tests de contrôle qualité à réaliser de manière obligatoire.

Fin 2007-début 2008, a eu lieu la révolution des cellules iPS. Les travaux de Yamanaka se sont révélés faciles à reproduire pour de nombreux groupes. Les cellules iPS sont plus accessibles que les cellules hES, non seulement pour les pays qui n'ont pas l'autorisation d'utiliser ces cellules, mais aussi parce que les techniques de reprogrammation sont plus faciles à mettre en œuvre que celles de dérivation à partir d'embryons.

Dès lors, les travaux se sont multipliés, les avancées pour optimiser l'utilisation de ces cellules apparaissent déjà et vont en s'accéléralant. Car il faut encore résoudre quelques problèmes avant de pouvoir envisager leur utilisation en thérapie. Un des premiers aspects à traiter concerne l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour ré-exprimer les quatre facteurs dits aujourd'hui de Yamanaka. Un groupe a réussi à limiter le nombre de facteurs à 2 (Kim, Zaehres et al. 2008), tandis qu'un autre a réussi à s'affranchir des quatre vecteurs lentiviraux (Stadtfield, Nagaya et al. 2008). Ces efforts ont été stimulés par les travaux de Nakagawa et collaborateurs qui visaient à se débarrasser de la ré-introduction de C-MYC (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). Cependant, ce groupe montrait que la reprogrammation en elle-même induisait l'expression de C-MYC endogène (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008).

Limiter les manipulations génétiques semble le mot d'ordre, pour ne pas avoir d'intégration des vecteurs lentiviraux, mais aussi préférer l'expression transitoire et ne plus se baser sur un

marqueur de sélection des cellules iPS, sont les progrès à apporter pour diminuer les risques d'utilisation de ces cellules en thérapie. Un groupe utilise aujourd'hui un critère morphologique pour isoler les cellules iPS murines (Blueloch, Venere et al. 2007).

Les efforts doivent être poursuivis aussi bien sur les ES que sur les cellules iPS concernant le risque de formation de tératome, inhérent à ces deux types de cellules pluripotentes. Car les espoirs d'application sont nourris. En première ligne, viennent les espoirs de thérapie « à la carte » qui permettraient de limiter le rejet de greffe de cellules, puisqu'il s'agirait de cellules autologues.

Les cellules iPS constituent également un outil de recherche dans plusieurs domaines : celui de la reprogrammation, pour comprendre les mécanismes mis en œuvre, celui du développement, pour étudier les anomalies pathogènes, mais aussi le domaine du cancer, pour découvrir de nouvelles cibles en comparant cellules iPS dérivées de cellules cancéreuses et cellules normales. Il est apparu que certaines cellules cancéreuses étaient réfractaires à la dérivation de cellules iPS (Nishikawa, Goldstein et al. 2008). Là encore, en comprendre les raisons permettrait d'approfondir encore les connaissances sur le cancer et surtout d'apporter de nouvelles pistes thérapeutiques.

La modélisation pathologique à partir de cellules iPS va permettre d'élargir le spectre des atteintes étudiées et des avancées spectaculaires sont à prévoir dans les connaissances sur ces pathologies autant que sur le criblage de composés chimiques à haut débit, si tant est que les progrès sur les essais de différenciation en différents types de cellules somatiques soient réalisés rapidement. Une activité de mise en banque de cellules iPS dérivées de patients a été entamée (Park, Arora et al. 2008).

Malgré tous les espoirs que suscitent les cellules iPS, les cellules ES n'en suscitent pas moins et les études sur la stabilité en culture, et les potentiels de différenciation sont menés en parallèle sur les deux types de cellules pluripotentes. Les connaissances dont la communauté scientifique s'est enrichie grâce aux cellules ES permettent d'anticiper sur les cellules iPS, notamment en ce qui concerne la stabilité génétique et épigénétique en culture, les différences entre les lignées dérivées et le besoin de réaliser des études comparatives sur génomes entiers. Les aspects réglementaires concernant l'utilisation de cellules ES en thérapie cellulaire pourraient être directement appliqués à l'utilisation des cellules iPS puisqu'ils concernent l'absence de composés d'origine animale, et la présence de cellules indifférenciées associées au risque de formation de tératome.

Bibliographie

- Abu-Issa, R., K. Waldo, et al. (2004). "Heart fields: one, two or more?" Dev Biol **272**(2): 281-5.
- Adewumi, O., B. Aflatoonian, et al. (2007). "Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative." Nat Biotechnol **25**(7): 803-16.
- Alison, M. R., R. Poulson, et al. (2000). "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." Nature **406**(6793): 257.
- Alpdogan, O., C. Schmaltz, et al. (2001). "Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease." Blood **98**(7): 2256-65.
- Amit, M. (2007). "Feeder-layer free culture system for human embryonic stem cells." Methods Mol Biol **407**: 11-20.
- Arai, A., K. Yamamoto, et al. (1997). "Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation." Dev Dyn **210**(3): 344-53.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-40.
- Bachoud-Levi, A. C., V. Gaura, et al. (2006). "Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study." Lancet Neurol **5**(4): 303-9.
- Bachoud-Levi, A. C., P. Remy, et al. (2000). "Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation." Lancet **356**(9246): 1975-9.
- Barberi, T., M. Bradbury, et al. (2007). "Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells." Nat Med **13**(5): 642-8.
- Bartlett, R.J., Winland, et al. (1996). "Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs." Am J Vet Res **57** (5): 650-4.
- Bartunek, J., M. Vanderheyden, et al. (2005). "Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety." Circulation **112**(9 Suppl): I178-83.
- Bearzi, C., M. Rota, et al. (2007). "Human cardiac stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14068-73.
- Behfar, A., L. V. Zingman, et al. (2002). "Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart." Faseb J **16**(12): 1558-66.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, et al. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." Cell **114**(6): 763-76.
- Bianchi, D. W., G. K. Zickwolf, et al. (1996). "Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 705-8.
- Bjorklund, A., S. B. Dunnett, et al. (2003). "Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease." Lancet Neurol **2**(7): 437-45.
- Bjornson, C. R., R. L. Rietze, et al. (1999). "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo." Science **283**(5401): 534-7.
- Black, A. F., F. Berthod, et al. (1998). "In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent." Faseb J **12**(13): 1331-40.
- Blelloch, R., M. Venere, et al. (2007). "Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection." Cell Stem Cell **1**(3): 245-7.
- Boiani, M. and H. R. Scholer (2005). "Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 872-84.
- Bosnali, M. and F. Edenhofer (2008). "Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2." Biol Chem **389**(7): 851-61.

- Bradley, J. A., E. M. Bolton, et al. (2002). "Stem cell medicine encounters the immune system." Nat Rev Immunol **2**(11): 859-71.
- Brimble, S. N., X. Zeng, et al. (2004). "Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001." Stem Cells Dev **13**(6): 585-97.
- Buckingham, M., S. Meilhac, et al. (2005). "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells." Nat Rev Genet **6**(11): 826-35.
- Buzzard, J. J., N. M. Gough, et al. (2004). "Karyotype of human ES cells during extended culture." Nat Biotechnol **22**(4): 381-2; author reply 382.
- Cameron, C. M., W. S. Hu, et al. (2006). "Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation." Biotechnol Bioeng **94**(5): 938-48.
- Capi, O. and L. Gepstein (2006). "Myocardial regeneration strategies using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." J Control Release **116**(2): 211-8.
- Carrier, R. L., M. Papadaki, et al. (1999). "Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization." Biotechnol Bioeng **64**(5): 580-9.
- Caspi, O., I. Huber, et al. (2007). "Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts." J Am Coll Cardiol **50**(19): 1884-93.
- Caspi, O., I. Itzhaki, et al. (2008). "In Vitro Electrophysiological Drug Testing using Human Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes." Stem Cells Dev.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.
- Chase, L. G. and M. T. Firpo (2007). "Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells." Curr Opin Chem Biol **11**(4): 367-72.
- Chetboul, V., C. Escriou, et al. (2004). "Tissue Doppler imaging detects early asymptomatic myocardial abnormalities in a dog model of Duchenne's cardiomyopathy." Eur Heart J **25**(21): 1934-9.
- Chidgey, A. P., D. Layton, et al. (2008). "Tolerance strategies for stem-cell-based therapies." Nature **453**(7193): 330-7.
- Choi, K., M. Kennedy, et al. (1998). "A common precursor for hematopoietic and endothelial cells." Development **125**(4): 725-32.
- Christoffels, V. M., M. T. Mommersteeg, et al. (2006). "Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18." Circ Res **98**(12): 1555-63.
- Christoforou, N. and J. D. Gearhart (2007). "Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies." Prog Cardiovasc Dis **49**(6): 396-413.
- Clayes A. (2006). "Rapport sur les recherches sur le fonctionnement des cellules humaines" Rapport Assemblée Nationale N°3498
- Conley, B. J., A. O. Trounson, et al. (2004). "Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives." Fetal Diagn Ther **19**(3): 218-23.
- Coulombel, L. (2003). "[Adult stem cells: seing is not being]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 683-94.
- Cui, L., K. Johkura, et al. (2007). "Structural differentiation, proliferation, and association of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vitro and in their extracardiac tissues." J Struct Biol **158**(3): 307-17.
- Dai, W., L. J. Field, et al. (2007). "Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts." J Mol Cell Cardiol **43**(4): 504-16.

- Dang, S. M., S. Gerecht-Nir, et al. (2004). "Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture." Stem Cells **22**(3): 275-82.
- Dangain, J. and G. Vrbova (1984). "Muscle development in mdx mutant mice." Muscle Nerve **7**(9): 700-4.
- Davila, J. C., G. G. Cezar, et al. (2004). "Use and application of stem cells in toxicology." Toxicol Sci **79**(2): 214-23.
- de Bouard, S., C. Christov, et al. (2002). "Invasion of human glioma biopsy specimens in cultures of rodent brain slices: a quantitative analysis." J Neurosurg **97**(1): 169-76.
- Deconinck, A. E., J. A. Rafael, et al. (1997). "Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy." Cell **90**(4): 717-27.
- Draper, J. S., C. Pigott, et al. (2002). "Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture." J Anat **200**(Pt 3): 249-58.
- Draper, J. S., K. Smith, et al. (2004). "Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **22**(1): 53-4.
- Drukker, M., G. Katz, et al. (2002). "Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9864-9.
- Dunnett, S. B. and A. E. Rosser (2007). "Stem cell transplantation for Huntington's disease." Exp Neurol **203**(2): 279-92.
- Edwards, F. A., A. Konnerth, et al. (1989). "A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system." Pflugers Arch **414**(5): 600-12.
- Fagniez, P.L. (2006) "Les cellules souches et choix éthiques" rapport au premier ministre. La Documentation Française
- Fazel, S., M. Cimini, et al. (2006). "Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines." J Clin Invest **116**(7): 1865-77.
- Fehling, H. J., G. Lacaud, et al. (2003). "Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation." Development **130**(17): 4217-27.
- Finsterer, J. and C. Stollberger (2003). "The heart in human dystrophinopathies." Cardiology **99**(1): 1-19.
- Friedrich, O., F. von Wegner, et al. (2008). "L-type Ca²⁺ channel function is linked to dystrophin expression in mammalian muscle." PLoS ONE **3**(3): e1762.
- Gahwiler, B. H., M. Capogna, et al. (1997). "Organotypic slice cultures: a technique has come of age." Trends Neurosci **20**(10): 471-7.
- Gandolfi, A. J., K. Brendel, et al. (1995). "Use of tissue slices in chemical mixture toxicology and interspecies investigations." Toxicology **105**(2-3): 285-90.
- Gerecht-Nir, S., S. Cohen, et al. (2004). "Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation." Biotechnol Bioeng **86**(5): 493-502.
- Ginis, I., Y. Luo, et al. (2004). "Differences between human and mouse embryonic stem cells." Dev Biol **269**(2): 360-80.
- Gluckman, E., H. A. Broxmeyer, et al. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." N Engl J Med **321**(17): 1174-8.
- Goldberg, G. L., O. Alpdogan, et al. (2007). "Enhanced immune reconstitution by sex steroid ablation following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation." J Immunol **178**(11): 7473-84.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.

- Grady, R. M., H. Teng, et al. (1997). "Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy." Cell **90**(4): 729-38.
- Guhr, A., A. Kurtz, et al. (2006). "Current state of human embryonic stem cell research: an overview of cell lines and their use in experimental work." Stem Cells **24**(10): 2187-91.
- Halbach, M., F. Pillekamp, et al. (2006). "Ventricular slices of adult mouse hearts--a new multicellular in vitro model for electrophysiological studies." Cell Physiol Biochem **18**(1-3): 1-8.
- Hammond, T. G. and J. M. Hammond (2001). "Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel." Am J Physiol Renal Physiol **281**(1): F12-25.
- Hannes, T., M. Halbach, et al. (2008). "Biological pacemakers: characterization in an in vitro coculture model." J Electrocardiol.
- He, J. Q., Y. Ma, et al. (2003). "Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization." Circ Res **93**(1): 32-9.
- Heng, B. C., H. Haider, et al. (2004). "Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro." Cardiovasc Res **62**(1): 34-42.
- Herzenberg, L. A., D. W. Bianchi, et al. (1979). "Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(3): 1453-5.
- Hierlihy, A. M., P. Seale, et al. (2002). "The post-natal heart contains a myocardial stem cell population." FEBS Lett **530**(1-3): 239-43.
- Iida, M., T. Heike, et al. (2005). "Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation." Faseb J **19**(3): 371-8.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, et al. (2000). "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers." Mol Med **6**(2): 88-95.
- Jacob, S. and K. H. Moley (2005). "Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies." Pediatr Res **58**(3): 437-46.
- Jiang, X. X., Y. Zhang, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." Blood **105**(10): 4120-6.
- Joffre, O., T. Santolaria, et al. (2008). "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes." Nat Med **14**(1): 88-92.
- Kattman, S. J., E. D. Adler, et al. (2007). "Specification of multipotential cardiovascular progenitor cells during embryonic stem cell differentiation and embryonic development." Trends Cardiovasc Med **17**(7): 240-6.
- Kattman, S. J., T. L. Huber, et al. (2006). "Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages." Dev Cell **11**(5): 723-32.
- Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, et al. (2001). "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes." J Clin Invest **108**(3): 407-14.
- Kehat, I., L. Khimovich, et al. (2004). "Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **22**(10): 1282-9.
- Kennedy, M., S. L. D'Souza, et al. (2007). "Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures." Blood **109**(7): 2679-87.

- Kim, J. B., H. Zaehres, et al. (2008). "Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors." Nature **454**(7204): 646-50.
- King, T. J. and P. D. Lampe (2005). "Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues." Biochim Biophys Acta **1719**(1-2): 24-35.
- Kofidis, T., J. L. de Bruin, et al. (2004). "Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart muscle." J Thorac Cardiovasc Surg **128**(4): 571-8.
- Kouskoff, V., G. Lacaud, et al. (2005). "Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13170-5.
- Laflamme, M. A., K. Y. Chen, et al. (2007). "Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts." Nat Biotechnol **25**(9): 1015-24.
- Laflamme, M. A., J. Gold, et al. (2005). "Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells." Am J Pathol **167**(3): 663-71.
- Laird, D. W. (2005). "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation." Biochim Biophys Acta **1711**(2): 172-82.
- Lakshmipathy, U. and C. Verfaillie (2005). "Stem cell plasticity." Blood Rev **19**(1): 29-38.
- Lassar, A. B., B. M. Paterson, et al. (1986). "Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts." Cell **47**(5): 649-56.
- Laugwitz, K. L., A. Moretti, et al. (2005). "Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages." Nature **433**(7026): 647-53.
- Leor, J., S. Aboulafia-Etzion, et al. (2000). "Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?" Circulation **102**(19 Suppl 3): III56-61.
- Leor, J., Y. Amsalem, et al. (2005). "Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering." Pharmacol Ther **105**(2): 151-63.
- Leor, J. and S. Cohen (2004). "Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart." Ann N Y Acad Sci **1015**: 312-9.
- Leor, J., S. Gerecht-Nir, et al. (2007). "Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium." Heart.
- Lerou, P. H. and G. Q. Daley (2005). "Therapeutic potential of embryonic stem cells." Blood Rev **19**(6): 321-31.
- Leschik, J., S. Stefanovic, et al. (2008). "Cardiac commitment of primate embryonic stem cells." Nat Protoc **3**(9): 1381-7.
- Li, X. J., Z. W. Du, et al. (2005). "Specification of motoneurons from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **23**(2): 215-21.
- Liao, R., O. Pfister, et al. (2007). "The bone marrow--cardiac axis of myocardial regeneration." Prog Cardiovasc Dis **50**(1): 18-30.
- Lissauer, D., K. P. Piper, et al. (2007). "Persistence of fetal cells in the mother: friend or foe?" Bjog **114**(11): 1321-5.
- Liu, N., M. Lu, et al. (2007). "Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells." J Cell Physiol **211**(2): 279-86.
- Lunyak, V. V. and M. G. Rosenfeld (2008). "Epigenetic regulation of stem cell fate." Hum Mol Genet **17**(R1): R28-36.
- Maitra, A., D. E. Arking, et al. (2005). "Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells." Nat Genet **37**(10): 1099-103.
- Martin-Puig, S., Z. Wang, et al. (2008). "Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors." Cell Stem Cell **2**(4): 320-31.

- Martin, C. M., A. P. Meeson, et al. (2004). "Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart." *Dev Biol* **265**(1): 262-75.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634-8.
- Mateizel, I., N. De Temmerman, et al. (2006). "Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders." *Hum Reprod* **21**(2): 503-11.
- Matsuura, K., T. Nagai, et al. (2004). "Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes." *J Biol Chem* **279**(12): 11384-91.
- Mazhari, R. and J. M. Hare (2007). "Advances in cell-based therapy for structural heart disease." *Prog Cardiovasc Dis* **49**(6): 387-95.
- McNally, E. M. (2007). "New approaches in the therapy of cardiomyopathy in muscular dystrophy." *Annu Rev Med* **58**: 75-88.
- Messina, E., L. De Angelis, et al. (2004). "Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart." *Circ Res* **95**(9): 911-21.
- Mimeault, M. and S. K. Batra (2006). "Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies." *Stem Cells* **24**(11): 2319-45.
- Min, D., A. Panoskaltis-Mortari, et al. (2007). "Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging." *Blood* **109**(6): 2529-37.
- Mitalipov, M., J. Calhoun, et al. (2003). "Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos." *Stem Cells* **21**(5): 521-6.
- Mitsiadis, T. A., O. Barrandon, et al. (2007). "Stem cell niches in mammals." *Exp Cell Res* **313**(16): 3377-85.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* **113**(5): 631-42.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." *Science* **311**(5769): 1880-5.
- Moretti, A., L. Caron, et al. (2006). "Multipotent embryonic *isl1*+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification." *Cell* **127**(6): 1151-65.
- Mummery, C., D. Ward-van Oostwaard, et al. (2003). "Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells." *Circulation* **107**(21): 2733-40.
- Mummery, C., D. Ward, et al. (2002). "Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells." *J Anat* **200**(Pt 3): 233-42.
- Munsie, M. J., A. E. Michalska, et al. (2000). "Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei." *Curr Biol* **10**(16): 989-92.
- Murry, C. E., H. Reinecke, et al. (2006). "Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair." *J Am Coll Cardiol* **47**(9): 1777-85.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, et al. (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." *Nat Biotechnol* **26**(1): 101-6.
- Nakamura, T., M. Sano, et al. (2003). "A Wnt- and beta-catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10): 5834-9.
- Niebruegge, S., A. Nehring, et al. (2008). "Cardiomyocyte Production in Mass Suspension Culture: Embryonic Stem Cells As a Source for Great Amounts of Functional Cardiomyocytes." *Tissue Eng Part A*.
- Nishikawa, S., R. A. Goldstein, et al. (2008). "The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 725-9.

- Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, et al. (1998). "Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages." *Development* **125**(9): 1747-57.
- Niwa, H., J. Miyazaki, et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." *Nat Genet* **24**(4): 372-6.
- Oh, H., S. B. Bradfute, et al. (2003). "Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12313-8.
- Oliveira, R., C. Christov, et al. (2005). "Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas." *BMC Cell Biol* **6**(1): 7.
- Ott, H. C., T. S. Matthiesen, et al. (2008). "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart." *Nat Med* **14**(2): 213-21.
- Park, I. H., N. Arora, et al. (2008). "Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell*.
- Park, S., K. S. Lee, et al. (2004). "Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors." *Neurosci Lett* **359**(1-2): 99-103.
- Partridge, C. R., C. D. Johnson, et al. (2005). "In vitro models to evaluate acute and chronic injury to the heart and vascular systems." *Toxicol In Vitro* **19**(5): 631-44.
- Partridge, T. (2006). "Disciplining the stem cell into myogenesis." *N Engl J Med* **354**(17): 1844-5.
- Pashmforoush, M., J. T. Lu, et al. (2004). "Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block." *Cell* **117**(3): 373-86.
- Pera, M. F. and A. O. Trounson (2004). "Human embryonic stem cells: prospects for development." *Development* **131**(22): 5515-25.
- Perino, M. G., S. Yamanaka, et al. (2008). "Cardiomyogenic stem and progenitor cell plasticity and the dissection of cardiopoiesis." *J Mol Cell Cardiol*.
- Perrier, A. L., V. Tabar, et al. (2004). "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12543-8.
- Pevny, L. H. and R. Lovell-Badge (1997). "Sox genes find their feet." *Curr Opin Genet Dev* **7**(3): 338-44.
- Pillekamp, F., M. Reppel, et al. (2006). "Impulse propagation in late-stage embryonic and neonatal murine ventricular slices." *J Electrocardiol* **39**(4): 425 e1-4.
- Pillekamp, F., M. Reppel, et al. (2005). "Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation." *Cell Physiol Biochem* **16**(1-3): 127-32.
- Pillekamp, F., M. Reppel, et al. (2007). "Force measurements of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in an in vitro transplantation model." *Stem Cells* **25**(1): 174-80.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-7.
- Pouly, J., A. A. Hagege, et al. (2004). "Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy?" *Circulation* **110**(12): 1626-31.
- Puceat, M. (2005). "[Embryonic stem cells to study early myocardial development and potential regenerative medicine]." *Med Sci (Paris)* **21**(12): 1076-82.
- Rambhatla, L., C. P. Chiu, et al. (2003). "Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells." *Cell Transplant* **12**(1): 1-11.
- Rao, M. (2008). "Scalable human ES culture for therapeutic use: propagation, differentiation, genetic modification and regulatory issues." *Gene Ther* **15**(2): 82-8.

- Reppel, M., F. Pillekamp, et al. (2004). "Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity." J Electrocardiol **37 Suppl**: 104-9.
- Reubinoff, B. E., P. Itsykson, et al. (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1134-40.
- Reubinoff, B. E., M. F. Pera, et al. (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro." Nat Biotechnol **18**(4): 399-404.
- Reyes, M., T. Lund, et al. (2001). "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." Blood **98**(9): 2615-25.
- Rideout, W. M., 3rd, K. Hochedlinger, et al. (2002). "Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy." Cell **109**(1): 17-27.
- Rodriguez-Sinovas, A., A. Cabestrero, et al. (2007). "The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling." Prog Biophys Mol Biol **94**(1-2): 219-32.
- Roell, W., T. Lewalter, et al. (2007). "Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia." Nature **450**(7171): 819-24.
- Sauer, H., J. Gunther, et al. (2000). "Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals." Am J Pathol **156**(1): 151-8.
- Sauer, H., M. Wartenberg, et al. (2001). "Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation." Cell Physiol Biochem **11**(4): 173-86.
- Schachinger, V., S. Erbs, et al. (2006). "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction." N Engl J Med **355**(12): 1210-21.
- Schachinger, V., S. Erbs, et al. (2006). "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial." Eur Heart J **27**(23): 2775-83.
- Schenke-Layland, K., K. E. Rhodes, et al. (2008). "Reprogrammed Mouse Fibroblasts Differentiate into Cells of the Cardiovascular and Hematopoietic Lineages." Stem Cells.
- Schroeder, M., S. Niebruegge, et al. (2005). "Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control." Biotechnol Bioeng **92**(7): 920-33.
- Schuldiner, M., J. Itskovitz-Eldor, et al. (2003). "Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene." Stem Cells **21**(3): 257-65.
- Segev, H., B. Fishman, et al. (2004). "Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters." Stem Cells **22**(3): 265-74.
- Seggewiss, R., K. Lore, et al. (2007). "Keratinocyte growth factor augments immune reconstitution after autologous hematopoietic progenitor cell transplantation in rhesus macaques." Blood **110**(1): 441-9.
- Serose, A., B. Prudhon, et al. (2005). "Administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both structure and function of delta-sarcoglycan deficient cardiac muscle in the hamster." Basic Res Cardiol **100**(2): 161-170.
- Shi, S. and S. Gronthos (2003). "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp." J Bone Miner Res **18**(4): 696-704.
- Shimozaki, K., K. Nakashima, et al. (2003). "Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures." Development **130**(11): 2505-12.
- Siti-Ismail, N., A. E. Bishop, et al. (2008). "The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance." Biomaterials **29**(29): 3946-52.
- Smith, R. R., L. Barile, et al. (2007). "Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens." Circulation **115**(7): 896-908.

- Solan, J. L. and P. D. Lampe (2005). "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly." *Biochim Biophys Acta* **1711**(2): 154-63.
- Stadtfeld, M., K. Brennand, et al. (2008). "Reprogramming of Pancreatic beta Cells into Induced Pluripotent Stem Cells." *Curr Biol*.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, et al. (2008). "Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration." *Science*.
- Stamp, L., H. A. Crosby, et al. (2005). "A novel cell-surface marker found on human embryonic hepatoblasts and a subpopulation of hepatic biliary epithelial cells." *Stem Cells* **23**(1): 103-12.
- Stedman, H. H., H. L. Sweeney, et al. (1991). "The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy." *Nature* **352**(6335): 536-9.
- Stefanovic, S. and M. Puceat (2007). "Oct-3/4: not just a gatekeeper of pluripotency for embryonic stem cell, a cell fate instructor through a gene dosage effect." *Cell Cycle* **6**(1): 8-10.
- Stoppini, L., P. A. Buchs, et al. (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." *J Neurosci Methods* **37**(2): 173-82.
- Stoppini, L., S. Duport, et al. (1997). "A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures." *J Neurosci Methods* **72**(1): 23-33.
- Sutherland, J. S., G. L. Goldberg, et al. (2005). "Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade." *J Immunol* **175**(4): 2741-53.
- Sutherland, J. S., L. Spyroglou, et al. (2008). "Enhanced immune system regeneration in humans following allogeneic or autologous hemopoietic stem cell transplantation by temporary sex steroid blockade." *Clin Cancer Res* **14**(4): 1138-49.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-72.
- Tan, X. W., H. Liao, et al. (2005). "Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross the blood-brain barrier?" *Stem Cells* **23**(10): 1443-52.
- Theise, N. D., M. Nimmakayalu, et al. (2000). "Liver from bone marrow in humans." *Hepatology* **32**(1): 11-6.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-7.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7844-8.
- Thomson, J. A. and J. S. Odorico (2000). "Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines." *Trends Biotechnol* **18**(2): 53-7.
- Tillmanns, J., M. Rota, et al. (2008). "Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(5): 1668-73.
- Tomescot, A., J. Leschik, et al. (2007). "Differentiation in vivo of Cardiac Committed Human Embryonic Stem Cells in Post-myocardial Infarcted Rats." *Stem Cells*.
- van Laake, L. W., R. Passier, et al. (2008). "Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and cardiac repair in rodents." *Circ Res* **102**(9): 1008-10.
- Vescovi, A. L., A. Gritti, et al. (1999). "Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells." *J Neurotrauma* **16**(8): 689-93.
- Vilquin, J. T. and J. P. Marolleau (2004). "[Cell transplantation in heart failure management]." *Med Sci (Paris)* **20**(6-7): 651-62.
- Wakayama, T., V. Tabar, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer." *Science* **292**(5517): 740-3.

- Watanabe, K., M. Ueno, et al. (2007). "A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **25**(6): 681-6.
- Weber, A., J. P. Delgado, et al. (2006). "Primate hepatic foetal progenitor cells and their therapeutic potential." Pathol Biol (Paris) **54**(2): 58-63.
- Wils, E. J., E. Braakman, et al. (2007). "Flt3 ligand expands lymphoid progenitors prior to recovery of thymopoiesis and accelerates T cell reconstitution after bone marrow transplantation." J Immunol **178**(6): 3551-7.
- Wobus, A. M., G. Wallukat, et al. (1991). "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers." Differentiation **48**(3): 173-82.
- Wollert, K. C., G. P. Meyer, et al. (2004). "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial." Lancet **364**(9429): 141-8.
- Wu, S. M., K. R. Chien, et al. (2008). "Origins and fates of cardiovascular progenitor cells." Cell **132**(4): 537-43.
- Xiao, Y. F. (2003). "Cardiac application of embryonic stem cells." Sheng Li Xue Bao **55**(5): 493-504.
- Xu, C., S. Police, et al. (2002). "Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells." Circ Res **91**(6): 501-8.
- Xu, Y., Y. Shi, et al. (2008). "A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine." Nature **453**(7193): 338-44.
- Yamaguchi, T. P., D. J. Dumont, et al. (1993). "flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors." Development **118**(2): 489-98.
- Yamashita, J. K., M. Takano, et al. (2005). "Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction." Faseb J **19**(11): 1534-6.
- Yang, L., M. H. Soonpaa, et al. (2008). "Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population." Nature **453**(7194): 524-8.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.
- Zeineddine, D., E. Papadimou, et al. (2006). "Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development." Dev Cell **11**(4): 535-46.
- Zhan, X., G. Dravid, et al. (2004). "Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro." Lancet **364**(9429): 163-71.
- Zhang, W., W. Ge, et al. (2004). "Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." Stem Cells Dev **13**(3): 263-71.
- Zimmermann, W. H., M. Didie, et al. (2002). "Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats." Circulation **106**(12 Suppl 1): I151-7.
- Zimmermann, W. H., I. Melnychenko, et al. (2004). "Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts." Biomaterials **25**(9): 1639-47.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-95.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-28.

Annexe

An *in vitro* beating heart model for long term assessment of experimental therapeutics

Walter Habeler, Séverine Pouillot, Alexandra Plancheron, Michel Pucéat, Marc Peschanski and Christelle Monville *.

INSERM/UEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbruères, Evry 91030 cedex,
France

Abstract

Aim: Within the framework of studies aiming at regenerative medicine for cardiovascular disease, we have developed an *in vitro* model to analyse human embryonic stem cell engraftment into the myocardium.

Methods and results: This model is based on organotypic rat ventricular slices maintained in culture at the air-medium interface on semiporous membranes. Survival and differentiation of human cardiomyocytes derived from embryonic stem cells were then assessed for several months. In addition, we observed that ventricular tissue slices not only exhibited normal histology, but also rhythmic contractions till the end of the experiments (up to 3 months). Similar results were obtained using ventricular slices obtained from two human fetuses at 8 and 9.5 weeks of age. Calcium transients were associated to the beating frequency, and the pattern was modulated in a dose-dependent manner by epinephrine.

Conclusion: Our data suggest that the organotypic heart slice culture on semiporous membranes is a relevant *in vitro* heart model for long term histological and physiological studies.

An *in vitro* beating heart model for long term assessment of experimental therapeutics

Walter Habeler, Séverine Pouillot, Alexandra Plancheron, Michel Pucéat, Marc Peschanski and Christelle Monville *.

**INSERM/UEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbruères, Evry 91030
cedex, France**

Running title: in vitro beating organotypic heart slice

Corresponding author:

* Christelle Monville, INSERM/UEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbruères, Evry 91030 cedex, France, Tel: +33169908528, Fax: +33169908521, cmonville@istem.genethon.fr

Word count: 4221

Introduction

Development of cell therapy products to substitute for cardiomyocytes lost due to cardiovascular diseases has been a major field of research over the past ten years. A variety of cells have been contemplated, including skeletal myoblasts¹⁻⁶, mesenchymal stem cells from bone marrow⁷⁻¹⁰ and most recently embryonic stem (ES) cell derived cardiomyocytes¹¹⁻¹³ or cardiac committed stem cells¹⁴. However, functional results have been controversial calling for a reassessment of the mechanisms of action of the transplanted cells. It has, in particular, been difficult to determine whether a significant proportion of cells did engraft, whether some cells differentiated into fully mature cardiac myocytes, or whether such a differentiation process led to functional integration into the recipient heart^{14, 15}.

The precise answers to these questions have been difficult to provide for technical reasons, as data were derived from *in vivo* experiments, in the absence of *in vitro* models that would allow long-term assessment of cells transplanted into heart tissue. Preliminary attempts at designing such a model have been made¹⁶⁻¹⁸ on the basis of organotypic heart slice cultures designed to evaluate the toxicity of xenobiotics¹⁹. In their conditions, however, thin slice preparations of cardiac tissue could only be experimentally utilized for less than two weeks in culture due to poor viability¹⁶. Another, more complex model has been recently designed by decellularizing the heart while preserving the extra-cellular matrix and reseeding it with cardiac or endothelial cells²⁰.

We have reconsidered this important issue within the framework of studies aiming at substitutive cell therapy to the heart using cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. We have sought long term survival of heart tissue slices, with

good histological preservation, by applying to the heart the techniques designed for the so-called “chronic” brain slices²¹⁻²³ in which we managed recently to assess implanted cells for several months^{24,25}.

Methods

All experimentations were performed in strict accordance with the recommendations of the European Ethical Committee (EEC) (86/609 EEC), the French National Ethical Committee (87/848) and by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) for the care and use of laboratory animals. The human heart tissue was obtained following elective abortion, with specific parental consent for scientific use as an ancillary to an ongoing clinical protocol aiming at foetal neural grafting in patients with Huntington's disease ("MIG-HD", ref. NCT00190450). This investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Organotypic ventricular slice cultures, set up and characterization

Cultures were prepared from ventricular sections of 3 day-old rats (n=30, Charles River-France) and from an 8 and 9.5 week-old human foetuses. The hearts were removed and placed in Phosphate-Buffered Saline (PBS), the atria were removed and the ventricles sagittally sliced at 1 mm-thickness using a rodent heart matrix (Harvard Apparatus, UK) (Figure 1 supplementary data). The heart slices were immediately transferred to a Millicell-CM 0.4 μm membrane (Millipore, France) and the insert placed into a well containing 1ml of medium in 6 well-plates.

The culture medium consisted of Dulbecco's Modified Eagle's/F12 Medium (DMEM/F12) medium supplemented with 20% Knockout Serum Replacement (KSR), 1% non essential amino acids, 2mM L-glutamine, 0.1% β -mercaptoethanol, and 0,1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, France). Heart slices were maintained for 30-80 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Medium was changed three times a week. Slices were observed under an inverted microscope every other day.

Rate and rhythm of heart slice beating was characterized in parallel as well as the localization of the most apparent contractions. Further functional characterization of the contractile function of ventricular slices was carried out on 23 rat and 5 human heart slices, at 30 days after plating, using a stereomicroscope and a temperature-controlled stage set at 37°C. During these sessions, each slice was incubated with 10, 100 nM then 1 µM epinephrine (Sigma, France). Beating frequency was monitored 3 min after β-adrenergic stimulation.

Additional analysis was performed on 3 rat heart slices, at 30 days after plating using a confocal laser scanning microscope LSM510 (Zeiss), following incubation with 5µM fluo-4 AM (Invitrogen, France) for 20 min at 37°C.

Intra-slice cell implantations

Human embryonic stem cells (SA01, Cellartis, Sweden) were maintained on mitomycin C inactivated mouse embryonic fibroblasts feeder cells (STO, ATCC) in DMEM/F12 medium supplemented with 20% KSR, 1% non essential amino acids, 2 mM L-glutamine, 0.1% β-mercaptoethanol, and 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Invitrogen, France). Undifferentiated human ES cells were harvested and resuspended in the medium used for organotypic slice culture at a density of 1×10^5 cells/µl. 0.1 µl of this cell suspension was then injected into heart slice cultures, using a 0.5-µl Hamilton syringe fixed to the arm of a micromanipulator. Penetration of human ES cells into rat heart slices were quantified by counting human cells every 25 µm layers from the slice surface. Five sections of 5 different heart slices were analyzed.

The contraction rate of heart slices was monitored by daily observation using a Zeiss-Lumar V12 stereomicroscope.

Gene expression

Total RNA was extracted from heart slice cultures using TRIZOL Reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's protocol. RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen, France). cDNA was used as a template for gene expression analysis of human cardiac markers. Real-time quantitative PCR was performed using a Light Cycler with SYBR Green I master (Roche Diagnostic, France).

The following primer pairs were used: human-Oct-4 forward: 5'-CTT-GCT-GCA-GAA-GTG-GGT-GGA-GGA-A-3' and reverse: 5'-CTG-CAG-TGT-GGG-TTT-CGG-GCA-3'; human-Nanog forward: 5'-CAA-AGG-CAA-ACA-ACC-CAC-TT-3' and reverse: 5'-TCT-GCT-GGA-GGC-TGA-GGT-AT-3'; human-Gata4 forward: 5'-TCC-CTC-TTC-CCT-CCT-CAA-AT-3' and reverse: 5'-TCA-GCG-TGT-AAA-GGC-ATC-TG-3'; human-Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c) forward: 5'-CGC-ATG-AGA-GCC-GGA-CAA-ACT-3' and reverse: 5'-TGG-CTG-GAC-ACT-GGG-ATG-GAG-3'; human-atrial Myosin Light Chain (MLC2a) forward: 5'-CGG-GGA-ACA-TCG-ACT-ACA-AG-3' and reverse: 5'-TTT-CCA-ATT-TTG-CAA-CAG-AGT-TT-3'; human- β Myosin Heavy Chain (β -MHC) forward 5'-GGC-CCA-GAT-TCT-TCA-GGA-TT-3' and reverse 5'-TGG-CTG-GAC-ACT-GGG-ATG-GAG-3'; human-Atrial Natriuretic Peptide (ANP) forward: 5'-TGT-TGC-CAT-GGA-GTT-GTG-AT-3' and reverse: 5'-GAG-AGG-CGA-GGA-AGT-CAC-C-3'; human Ubiquitin C (UbC) forward 5'-ATT-TGG-GTC-GCG-GTT-CTT-G-3' and reverse 5'-TGC-CTT-GAC-ATT-CTC-GAT-GGT-3'; rat Ubiquitin C (UbC) was used as an internal control forward: 5'-TCG-TAC-CTT-TCT-CAC-CAC-AGT-ATC-TAG-3' and reverse: 5'-GAA-AAC-TAA-GAC-ACC-TCC-CCA-TCA-3'. Amplification PCR reaction was performed with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 60°C for 15

sec, and extension at 72°C for 15 sec. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized on human UbC. Melting curve analysis was used to determine the specificity of PCR products, which was confirmed using gel electrophoresis run.

Immunohistochemistry

Heart slices fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h at 4°C were cut into 10µm thick sections. The cryosections were washed with PBS and then incubated for 1 h at room temperature with a saturating solution consisting of 5% normal goat serum, 5% normal horse serum in PBS-0.6% Triton X-100 (Sigma, France). Slides were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies used at 1:400 anti-human nuclei mouse monoclonal (HNA, Chemicon France), anti-connexin 43 mouse monoclonal (CX43, Chemicon France), anti-rat CD31 mouse monoclonal (BD Pharmigen, France), anti troponin I rabbit polyclonal (cTNI, Chemicon France), anti-sarcomeric actinin mouse monoclonal (Sigma France), anti-desmin mouse monoclonal (Chemicon France), anti-human alpha-actinin mouse monoclonal (Chemicon France), anti-Ki67 mouse monoclonal (Chemicon France). After three washes with PBS, the slides were incubated with a 1:500 dilution of fluorescent-conjugated secondary antibodies for 1h at room temperature. Secondary antibodies used were: Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa-Fluor 555 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, France). The specificity of all secondary antibodies was test by incubation of only the secondary antibody without a pre-primary antibody incubation. All secondary antibodies were negative for non-specific staining in our immunostaining condition. After three washes the slices were incubated with 1/10000 DAPI and then the slides were mounted by using Fluoromount-G (CliniSciences,

France). The slides were observed under an epifluorescence microscope (Zeiss Imager Z1), and images processed using the Axio-vision software.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using ANOVA and a Student's test. For time course of cell differentiation statistical analysis was performed using ANOVA and Dunnett's test.

A value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Macroscopic analysis of the organotypic rat heart slices plated at the air-medium interface on semiporous membranes demonstrated good overall preservation over time (Figure 1A). Immuno-labelling of cardiomyocytes, using troponin I and sarcomeric alpha-actinin antibodies confirmed the regular organisation of the cells with little, if any, tissue disruption (Figure 1B, and Figure 2 supplementary data). Connexin 43 immunolabelling also revealed a dotted membranous distribution (Figure 1C), in keeping with that observed in histological sections of the heart. CD31 immunostaining additionally demonstrated the presence of a regular network of blood capillaries in the organotypic heart slices, comparable to that usually observed in sections of the organ (Figure 1D).

Human ES-cells differentiate into cardiomyocytes following intra-slice transplantation

Sixty days after transplantation of undifferentiated human ES cells into organotypic rat heart slices, HNA-positive human cells were readily observed (Figure 2B). These cells often clustered in several layers at the surface of the slices, but also dispersed in the tissue itself, intermingling with rat cells, or accumulating around blood vessels. The large majority of human cells ($81 \pm 2.3\%$) were located within 250 μm from heart slice surface (Figure 3 supplementary data). Microscopic observation of the cardiac matrix appeared intact which may have prevented the human ES cells from dispersing completely throughout the tissue.

The human cells expressed markers of differentiated cardiomyocytes, including troponin I (Figure 2B), and human-specific desmin (Figure 2C) and alpha-actinin

(Figure 2D), for both of which no cross-reactivity was observed in the surrounding rat tissue.

Expression of human specific genes was then monitored over time at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days after injection of undifferentiated human ES cells into rat heart slices using real time PCR (Figure 3). We observed a down-regulation of the undifferentiated stage markers Oct-4 and Nanog over the first weeks of culture (Figure 3A). Starting after 10 days and peaking at one month, gene expression of Gata4 and Mef2c increased, indicating cardiac mesoderm differentiation (Figure 3B). After two months, cells expressed myosin light chain 2a (MLC2a), β -myosin heavy chain (β -MHC) and atrial natriuretic peptide (ANP), three cardiac markers (Figure 3C).

In addition to human ES-derived cardiomyocytes, and intermingled with them, anti-Ki67 immunolabelling –co-registering with HNA- revealed a significant proportion of human cells that were still proliferating up to two months after implantation (Figure 2E).

In contrast, immunostaining with endo- and ectodermal markers was negative. There was neither teratoma in heart slices transplanted with human ES cells.

Heart slices in culture show spontaneous rhythmic contractions over months

Repeated stereomicroscopic observation to check preservation of tissue slices revealed that heart slices exhibited spontaneous and regular rhythmic contractions during the entire duration of the experiments (videos 1, 2 and 3, supplementary data). This phenomenon happened whether slices had received cell grafts or not and was thus considered an intrinsic functional property of the heart slice itself in our technical set up.

Contractions were most often visible macroscopically as rhythmic alteration of one or several portions of the slice. More rarely the entire piece of tissue would rise partially from the stage during a contraction (see e.g. video 3, supplementary data). The areas where contractions were observed macroscopically also varied from one observation session to another.

Each contraction lasted less than a few hundred milliseconds. The contraction rates were regular within the portion of the slice over time during an observation session, whereas two areas of the same slice could beat asynchronously. Beating rates were low, below 60 beats per minute (bpm) and in general between 30 and 40 bpm. The monitoring of spontaneous beating frequency of an organotypic rat heart slice at regular intervals over 81 days showed very little contraction rate change over time. Beating rate was usually recorded at 37°C but decrease in temperature down to 25°C had no visible impact on the frequency of contraction.

Rhythmic contractions of organotypic heart slices on semiporous membranes are associated with calcium waves and modulated by epinephrine

Physiological mechanisms underlying heart slice beating were explored by loading organotypic cultures with Fluo-4 AM ester. Confocal analysis of the temporal changes in fluorescence intensity showed rhythmic calcium transients in different regions of the heart slices (video 2, supplementary data). Quantification of these calcium oscillations showed that their rhythm was similar to that of the contractions observed macroscopically. Calcium waves were regular, not only over time but also in amplitudes at each local spot of analysis, where cells were excited in synchrony (Figure 4A).

Cardiomyocytes in the organotypic heart slices also responded to pharmacological manipulation, as demonstrated by applying epinephrine to the culture medium. This treatment increased spontaneous beating frequencies in a dose-dependent manner from 10nM to 1 μ M (Figure 4B). In parallel, confocal analysis of calcium currents in heart slices loaded with fluo-4 AM, showed a dose-dependent increase in Ca²⁺ transient amplitude and frequency with epinephrine (Figure 4C).

Organotypic human heart slice cultures at air-medium interface on semiporous membranes

One mm-thick organotypic heart ventricular slices were obtained from two human foetuses, at 8 and 9.5 weeks of gestational age, and plated at air-medium interface on semiporous membranes. In keeping with the results obtained with rat tissue, human organotypic heart slices exhibited preserved histological markers of cardiomyocytes and blood capillaries. In parallel, regular rhythmic contractions were observed up to the end of the observation period (60 days) at a beating rate comparable to that of rat slices (between 30 and 40 bpm, video 3, supplementary data). Addition of epinephrine to the culture medium at 10, 100nM and 1 μ M also increased spontaneous beating frequency of human heart slices in a dose-dependent manner (figure 4D).

Discussion

The main outcome of this study is the set up of an organotypic heart tissue culture method that allows long term histological and physiological studies, including from the human. This result was obtained by adapting to the heart the technique that allowed chronic organotypic brain slices by maintaining them at the air/medium interface on semiporous membranes. The organotypic heart slice system is a useful substrate to analyse after implantation long term cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. Preservation of cell excitability and intercellular connections was associated with long term persistency of regular rhythmic contractions and calcium transients. This continuous physiological activity makes organotypic heart slices on semiporous membranes suitable, in addition, for pharmacological studies.

Attempts at setting-up organotypic heart slice cultures have been made in the recent past by several authors, in a search similar to ours for models allowing testing of experimental therapeutics¹⁶⁻¹⁹. Standard histological staining in combination with immunohistological analysis for cardiac markers demonstrated that, originally, slices were structurally intact. The function of ion channels and receptors could be preserved, in contrast to the observation made on dissociated cardiomyocytes in culture. The main limitation in previous models was the survival time of the tissue, which only allowed for short term experimental evaluation (less than two weeks). Physiological recordings were even less encouraging, as they revealed a complete loss of network activity within 3 to 4 days. Comparison of these data to the vast literature concerning the much more studied organotypic brain slice cultures led us to surmise that, as was the case for the nervous system, the poor preservation of heart tissue over time in those studies was related to the immersion of the slice in the

culture medium²⁶. Long term preservation of organotypic brain slices has been readily obtained by replacing immersion by techniques that allowed direct oxygenation of the slices, either using slow rotation to create continuous changing of the liquid-gas interface²⁷, or by placing slices at the air-medium interface on a semiporous membrane²². We chose to develop the latter technique because it was suitable for subsequent intra-slice cell implantation^{24, 25}. Our results confirmed the long term preservation of the organotypic slices also for the heart in those air-medium interface conditions. It is interesting to underline the fact that this long term culture system preserved not only individual cells, but even more the pluricellular structures they form in the tissue. This was exemplified by the overall organization of well aligned cardiomyocytes potentially linked by gap junctions, the preservation of membrane-bound connexins, the presence of a dense network of blood vessels – though without blood- and the demonstration of calcium waves spreading along local arrays of excitable cardiomyocytes.

The original goal of the set-up of chronic heart slices was the search for an *in vitro* heart substrate to analyse grafted cells. The rat heart slices allowed us to address this issue quite successfully, as human embryonic stem cells implanted at a fully undifferentiated stage not only survived and integrated with the rat tissue but also readily differentiated into cardiomyocytes. This latter result is of particular interest as it was obtained without any priming of the cells to be implanted with cytokines that push ES cells toward the cardiomyogenic lineage. Embryoid bodies generated from stem cells primed with TGF-beta and BMP2 demonstrated an increased potential for cardiac differentiation, *in vitro*²⁸⁻²⁹. *In vivo*, transplantation of stem cells into heart also resulted in cardiac differentiation provided that TGF-beta/BMP2 signalling was intact^{15, 28}, but this capacity remained limited unless cardiomyocytes had been

previously damaged^{10, 30}. Organotypic heart slices seem, therefore, to replicate the latter situation as they provide a similarly appropriate environment for cardiomyogenic differentiation, indicating the preservation of the cardiac paracrine pathway required for therapeutic benefit of stem cell transplantation in diseased heart.

As an unexpected outcome of this study, preservation of spontaneously functional excitable networks was maintained for several months in the heart slices. The rhythm of the contractions was slow, in keeping with extranodal pacemakers in the ventricular slices. Notwithstanding that limitation, the slice model appears as a promising substrate for physiological analysis. It indeed displays regular contractions associated with calcium waves that spread over networks of cardiomyocytes that respond readily to the activation of β adrenergic receptors. This will allow for functional studies looking for the effects of drugs on cardiomyocytes, whether for pharmacological or pharmaco-toxicological purposes.

Funding

This study has been supported in part by additional grants from the Agence Nationale de la Recherche (CSCelo) and the cluster Medicen Paris Region (IngeCELL).

Acknowledgements

We thank Xavier Nissan for assistance with real-time PCR analysis, and Marc Lechuga with statistical analysis.

Conflict of Interest: none declared.

References

1. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996;**98**:2512-2523.
2. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, *et al.* Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;**4**:929-933.
3. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT *et al.* Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002;**106**:1131-136.
4. Hagège AA, Carrion C, Menasché P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP *et al.* Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;**361**:491-492.
5. Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:1078-1083.
6. Pagani, FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB *et al.* Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:879-888.

7. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**938**: 229-230.
8. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Hervé P *et al.* Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003;**108**:II253-258.
9. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:11474-11479.
10. Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskouei B *et al.* Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:2116-2124.
11. Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S *et al.* Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005;**167**:663-671.
12. Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* 2002;**91**:659-661.

13. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003;**93**:32-39.
14. Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, Dubois G, Messas E, Bruneval P *et al.* Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in post-myocardial infarcted rats. *Stem Cells* 2007;**25**:2200-2205.
15. Menasché P. Stem cells for clinical use in cardiovascular medicine: current limitations and future perspectives. *Thromb Haemost* 2005;**94**:697-701.
16. Pillekamp F, Reppel M, Dinkelacker V, Duan Y, Jazmati N, Bloch W *et al.* Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem* 2005;**16**:127-132.
17. Pillekamp F, Reppel M, Brockmeier K, Hescheler J. Impulse propagation in late-stage embryonic and neonatal murine ventricular slices. *J Electrocardiol* 2006;**39**:425e1-425e4.
18. Pillekamp F, Reppel M, Rubenchyk O, Pfannkuche K, Matzkies M, Bloch W *et al.* Force measurements of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in an in vitro transplantation model. *Stem Cells* 2007;**25**:174-180.

19. Gandolfi AJ, Brendel K, Fisher RL, Michaud JP. Use of tissue slices in chemical mixture toxicology and interspecies investigations. *Toxicology* 1995;**105**:285-290.
20. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008;**14**:213-221.
21. Gahwiler BH. Slice cultures of cerebellar, hippocampal and hypothalamic tissue. *Experientia* 1984;**40**:235-243.
22. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991;**37**:173-182.
23. Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M *et al.* Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005;**4**:435-452.
24. de Boüard S, Christov C, Guillamo JS, Kassir-Duchossoy L, Palfi S, Leguerinel C *et al.* Invasion of human glioma biopsy specimens in cultures of rodent brain slices: a quantitative analysis. *J Neurosurg* 2002;**97**:169-176.
25. Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, de Boüard S, Palfi S, Venance L *et al.* Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* 2005;**6**:1-17.

26. Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 1997;**20**:471-477.
27. Gähwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981;**4**:329-342.
28. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A *et al.* Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB* 2002; **16**:1558-1566.
29. Puceat M. TGFbeta in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2007;**74**:256-261.
30. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 2007;**21**:1345-1357.

Legends

Figure 1. **Histology of rat heart slices after 1 month of culture** (A) Stereomicroscope view, (B) anti-troponin I (green), (C) anti-connexin 43 (green), and (D) anti-CD31 (red) immunostaining. Nuclei are counterstained with DAPI (blue).

Figure 2. **Engraftment of human embryonic stem (hES) cells into organotypic rat heart slices.** (A) Schematic drawing showing the geometry of the heart slice, membrane, human cells grafted and the cutting plane. The cryostat sections were perpendicular to the semiporous membrane. (B) hES cells in the cardiac parenchyma, 60 days after implantation. Human nuclei are specifically stained by anti-HNA (in red), cTNI immunostaining (in green) and DAPI staining showing both human and rat cell nuclei (in blue), (C) anti-human desmin (red), (D) anti-human actinin (red), and (E) anti-human Ki67 (red) staining.

Figure 3. **Gene expression analysis of human cardiac markers.** (A) Real time PCR for Oct-4 and Nanog, (B) Gata4 and Mef2c, (C) MLC2a, β -MHC and ANP at different times after implantation of undifferentiated human ES cells into rat heart slices. * $p \leq 0.05$ and *** $p \leq 0.001$ as compared to human ES cells at day 0 (Dunnett's test after ANOVA). Data are means \pm s.e.m.

Figure 4. **Characterization of spontaneous contraction of rat and human heart slices.** (A) Ca^{2+} spiking within selected ROI of a heart slice loaded with fluo-4. Recordings are expressed as $\Delta F/F_0$, where F_0 is the lowest level of fluorescence. (B) Functional effects of epinephrine on heart slices in organotypic cultures. Dose-

response increase in frequency of rat slice beating. ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ as compared to untreated controls (Student's t-test after ANOVA). Data are means \pm s.e.m, n=23. (C) Ca^{2+} spiking recorded after loading with fluo-4 in a rat heart slice cultures at rest and during application of $1\mu\text{M}$ epinephrine. (D) Increase in frequency of human heart slices beating during epinephrine application vs control. Means \pm s.e.m, n=5.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

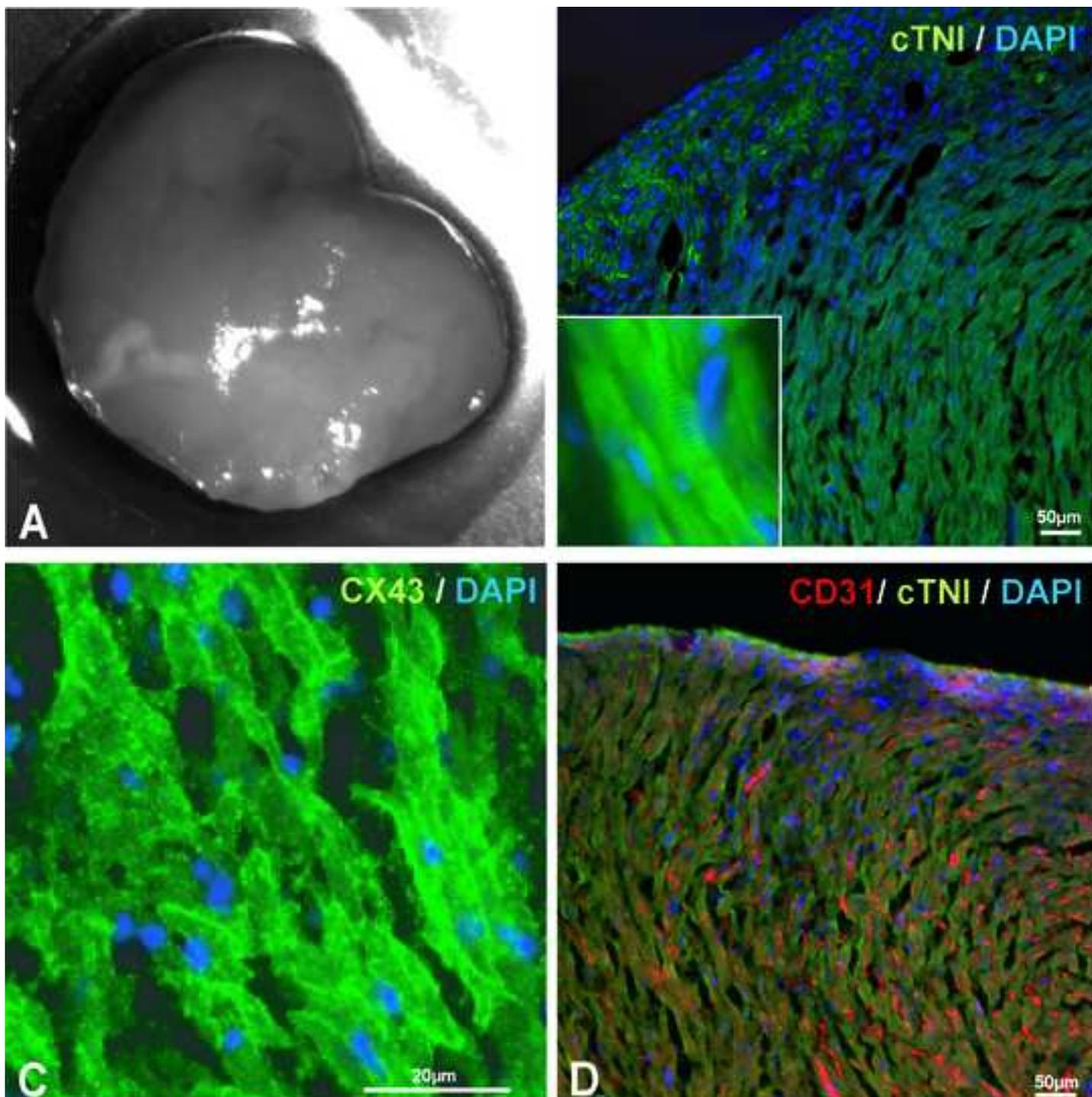


Fig 1 Habeler *et al.*

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

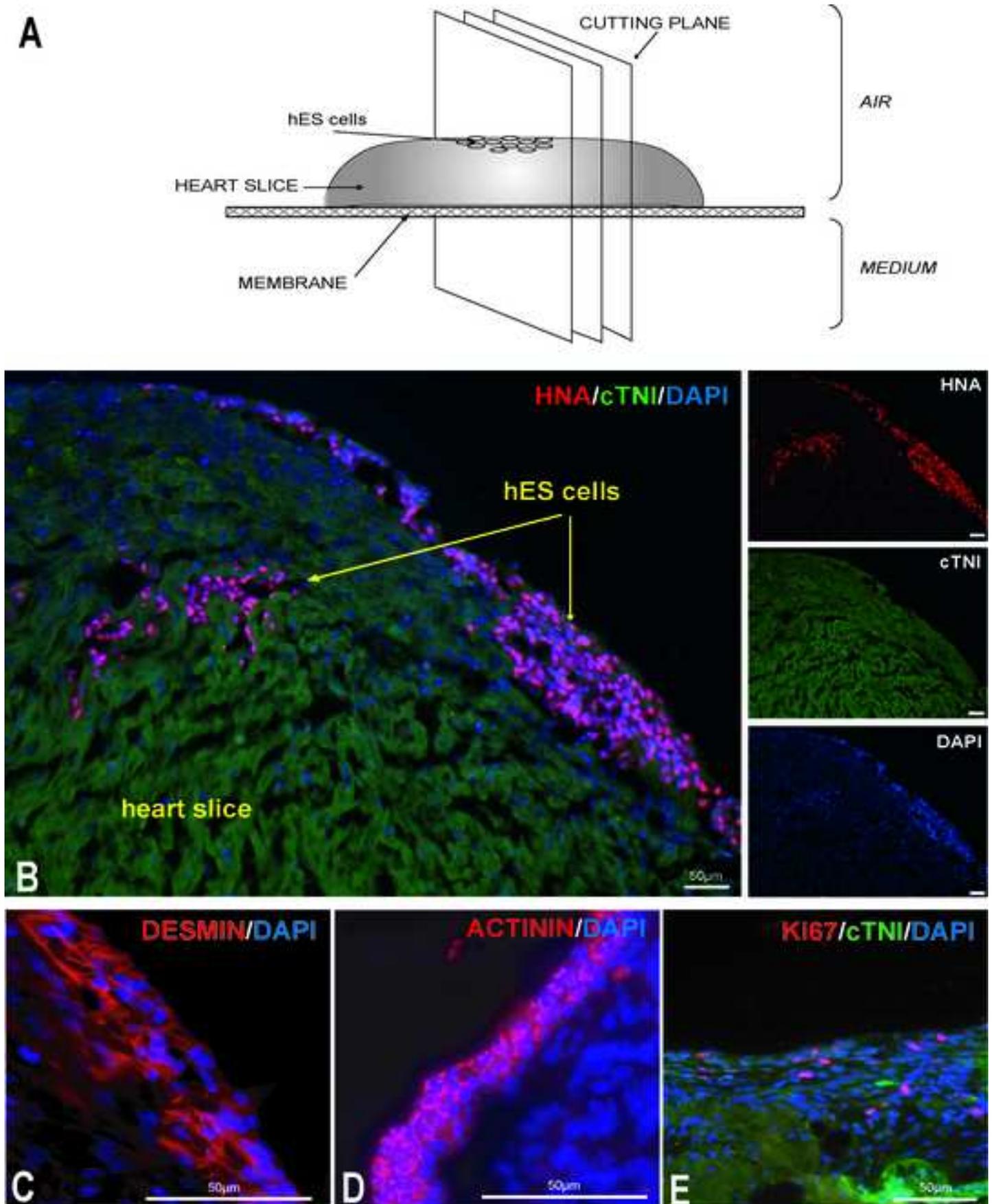


Fig 2 Habeler *et al.*

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

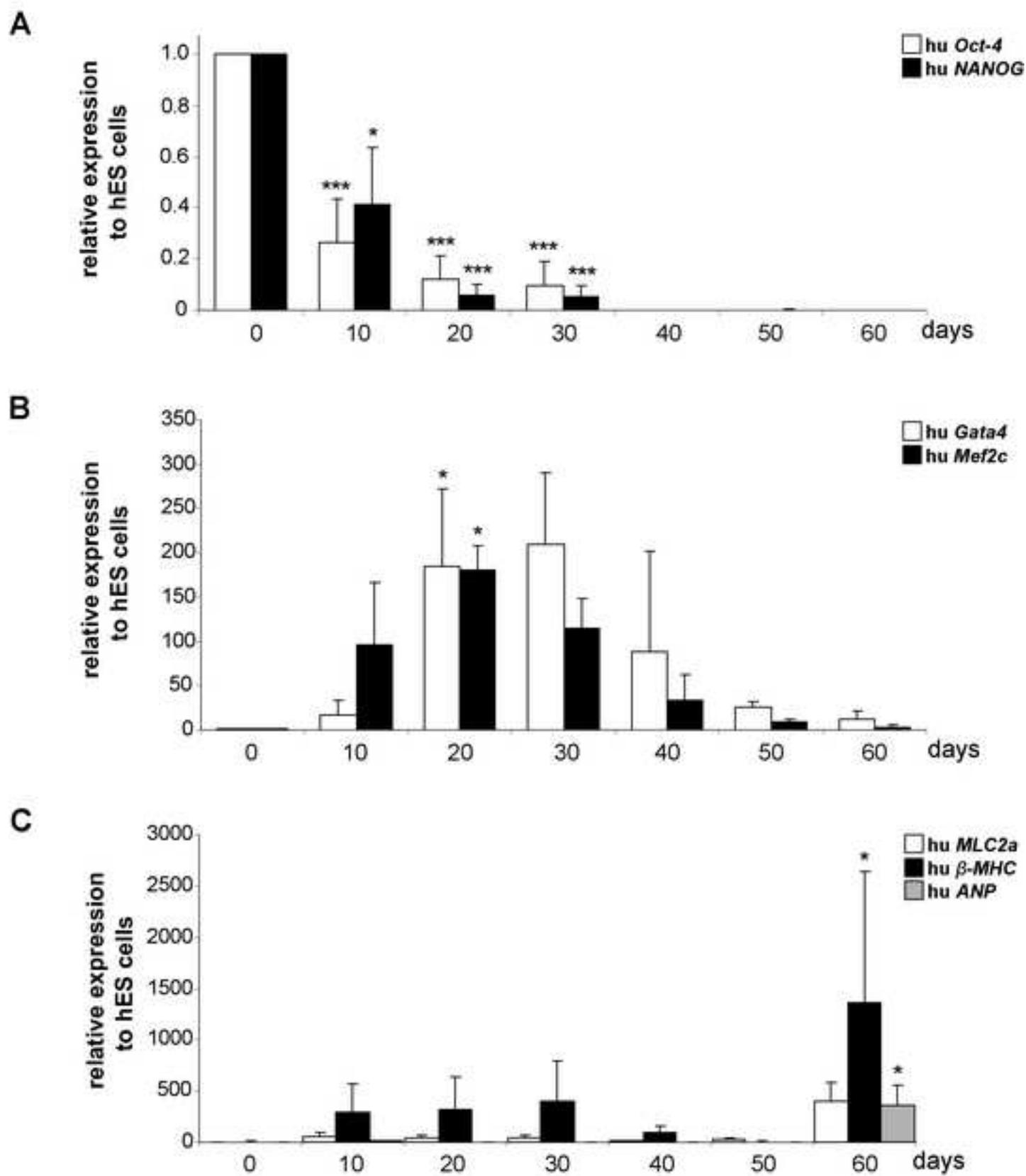


Fig 3 Habeler *et al.*

Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

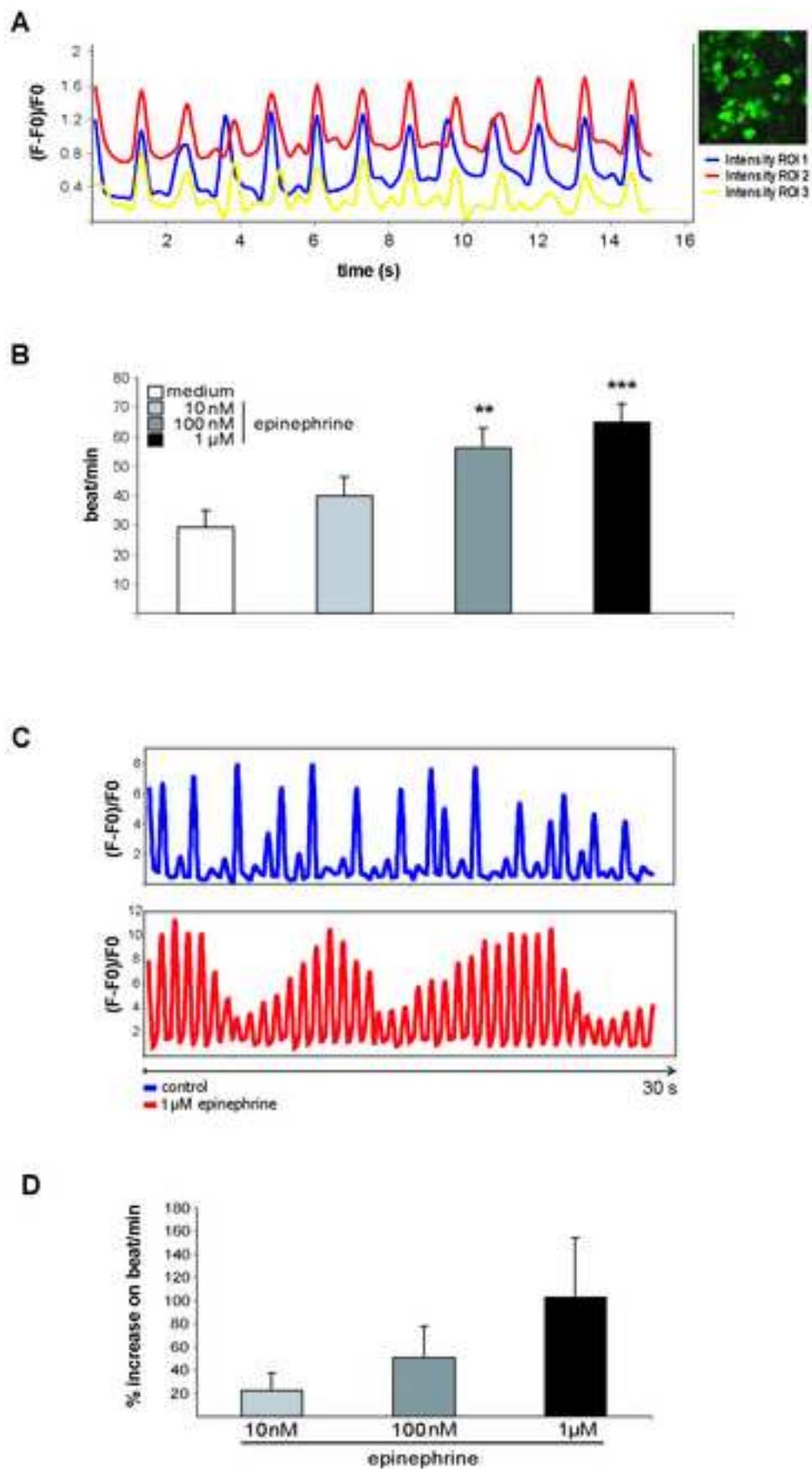


Fig 4 Habeler *et al.*

Supplementary data

Figure 1 (supplementary data) **Preparation of organotypic heart slice cultures.** (A) Ventricles of neonatal rat or foetal human are placed on heart matrix and cut in sagittal slices at a thickness of 1mm. (B) The slices are placed on Millipore membrane and cultures in 6 well-plates at 37°C in 5%CO₂ humidified atmosphere for up two month.

Figure 2 (supplementary data) **Immunostaining of a rat heart slice after 1 month in culture, with antibody directed again sarcomeric alpha-actinin.** Anti-alpha-actinin (red), nuclei were stained with DAPI (blue).

Figure 3 (supplementary data) **Proportion of human ES cells as a function of depth into heart slices two months after engraftment.** Data are means \pm s.e.m calculated every 25 μ m from the surface (n=5). Average width of the entire slices was $800 \pm 100\mu$ m

Supplementary **video 1.** Spontaneous contractions of a rat heart slice, cultured for 1 month, recorded using stereomicroscopy.

Supplementary **video 2.** Confocal imaging reconstruction of Ca²⁺ spiking in a rat heart slice loaded with fluo-4 AM.

Supplementary **video 3.** Stereomicroscopic observation of spontaneous beating of a human heart slice obtained from a 9.5 week-old foetus.

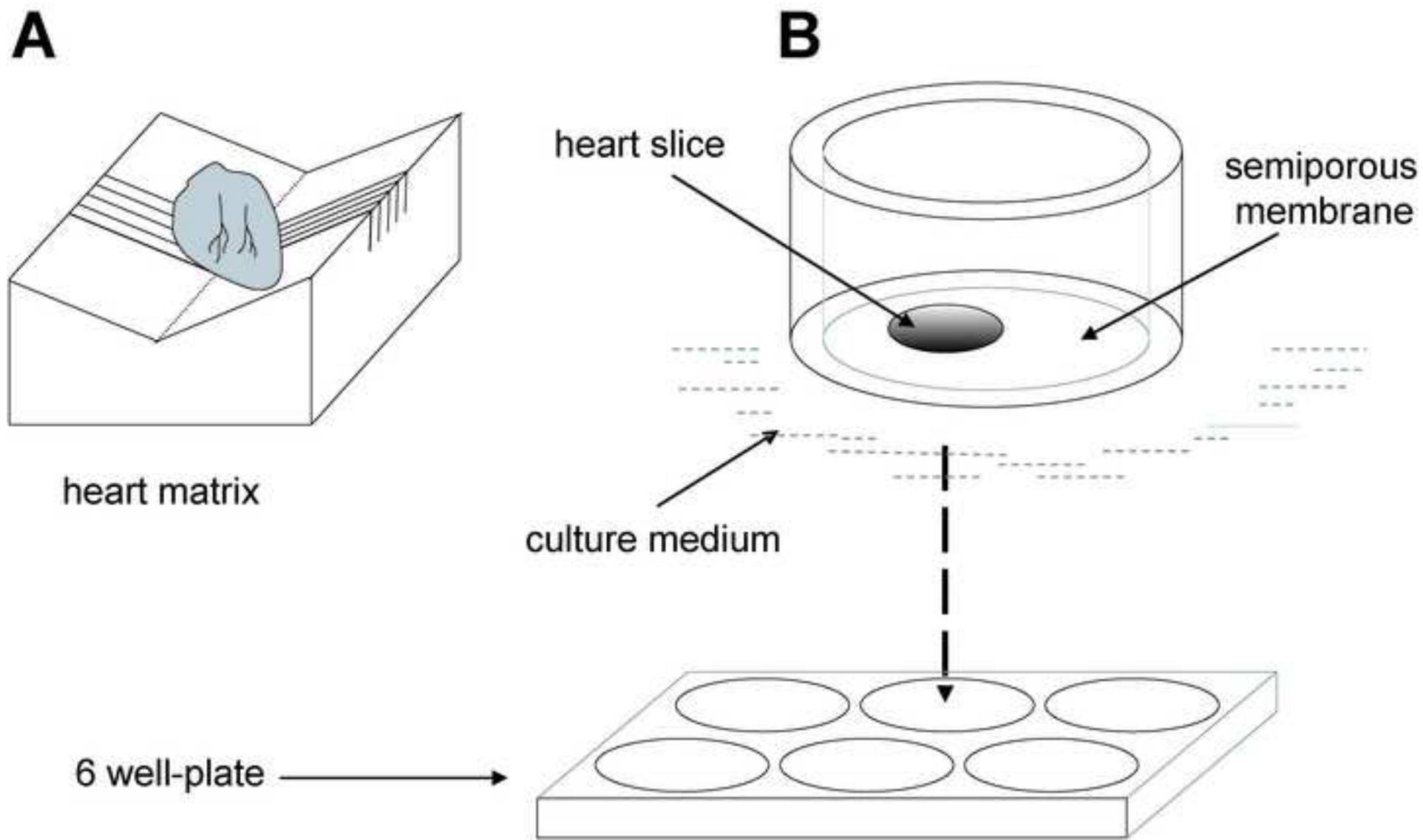


Fig 1 supplementary data Habeler et al.

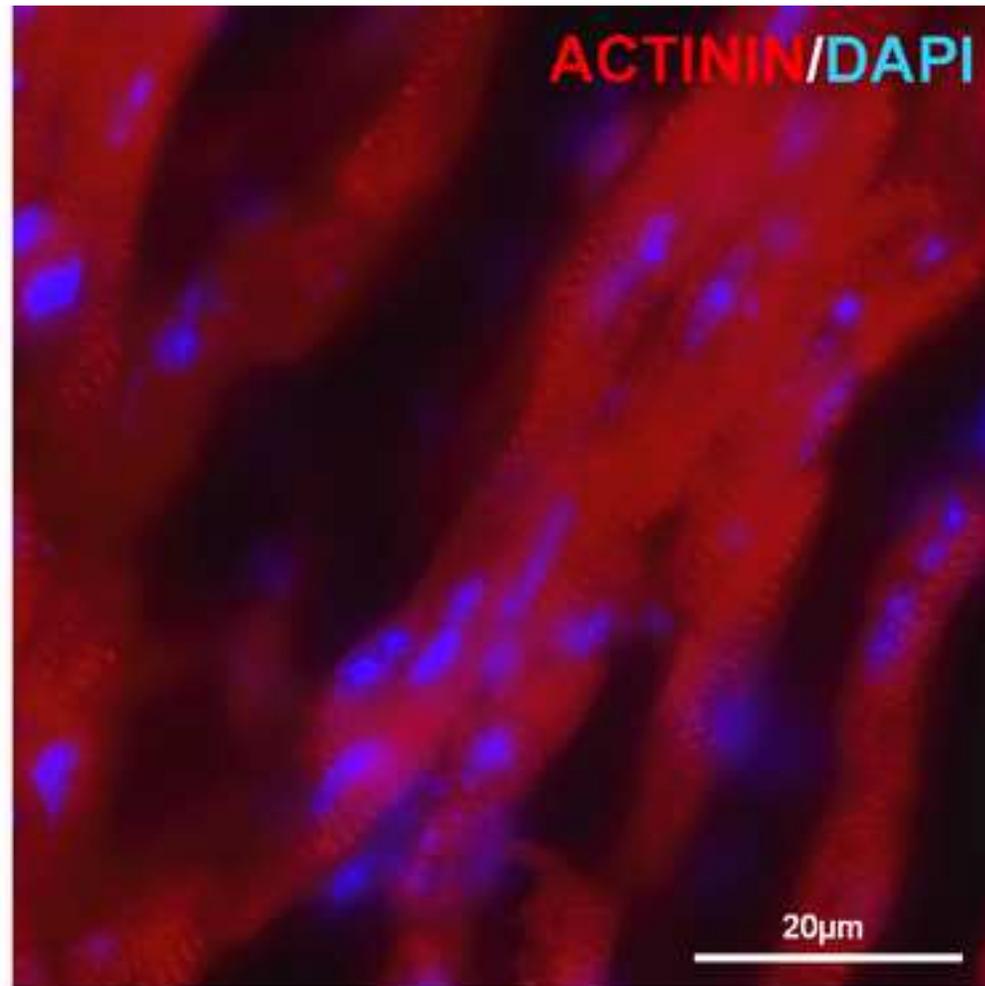


Fig 2 *supplementary data* Habeler et al.

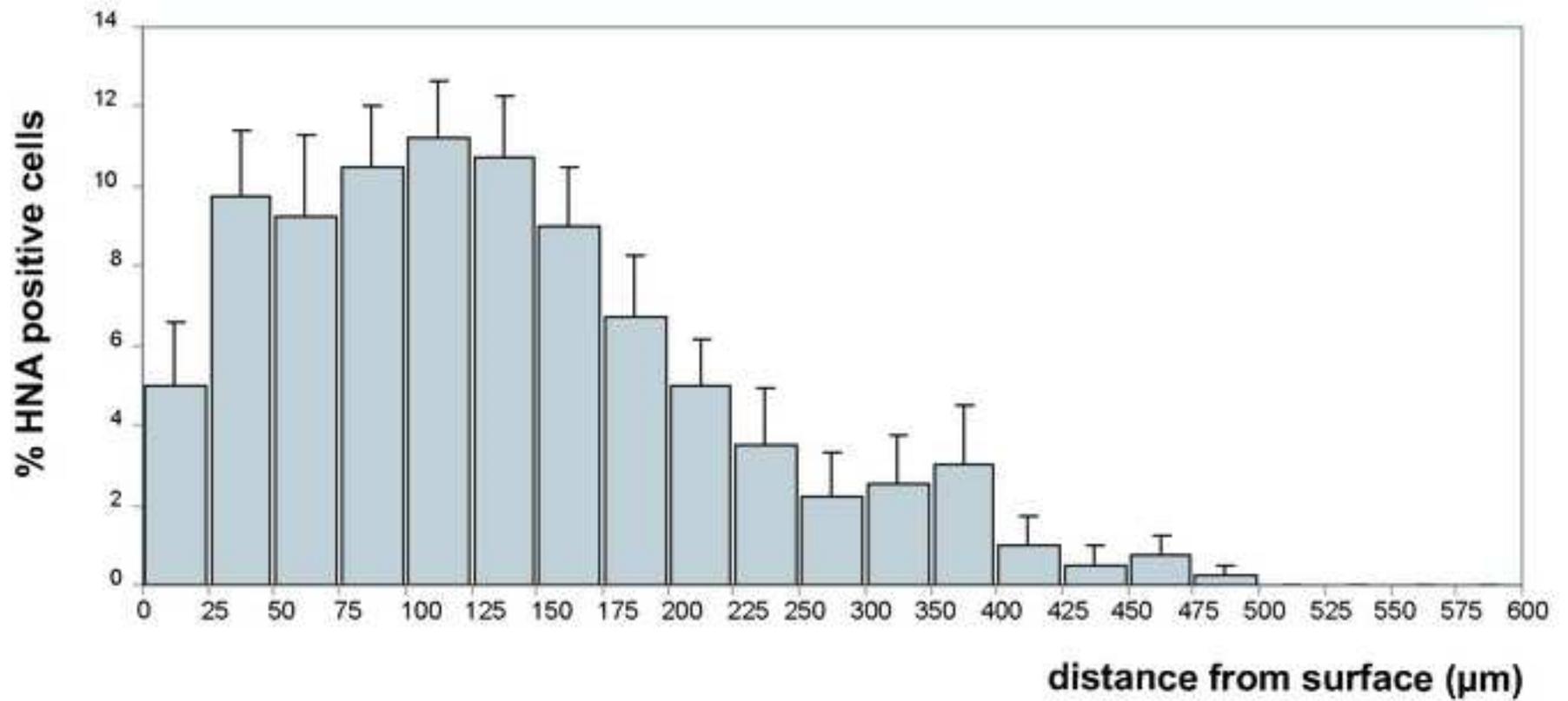


Fig 3 *supplementary data* Habeler *et al.*

Résumé

Les cardiomyopathies représentent une atteinte fréquemment associée aux dystrophies musculaires. Il n'existe actuellement pas de traitement de la cardiomyopathie associée à la dystrophie musculaire de Duchenne et les patients, du fait de leur jeune âge, ne peuvent recevoir de greffe de cœur. Les thérapies cellulaires cardiaques sont une réalité expérimentale et les avancées effectuées dans ce contexte avec les cellules souches sont très prometteuses comme nouvelle stratégie thérapeutique. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES), par leurs propriétés d'autorenouvellement et de différenciation dans de multiples lignages, sont les seules à pouvoir donner des cardiomyocytes. Elles représentent de ce fait des candidates pour la thérapie cellulaire cardiaque pour protéger le myocarde atteint et remplacer les cellules perdues.

Nous avons développé un modèle de culture organotypique de tranches ventriculaires présentant une structure tissulaire et des propriétés fonctionnelles conservées. Nous avons montré que notre modèle battait en culture pendant plusieurs mois et répondait à la présence de drogue chronotrope dans le milieu. Nous avons injecté des cellules hES indifférenciées dans ce modèle et nous avons pu retrouver les cellules greffées plusieurs mois après transplantation. De plus, nous avons mis en évidence que les cellules retrouvées étaient différenciées en cardiomyocytes.

Par ailleurs, nous avons validé le potentiel cardiogénique des lignées de cellules hES disponibles au laboratoire. Puis nous avons abordé différents protocoles dans le but d'optimiser le protocole de différenciation cardiaque pour améliorer le rendement en cardiomyocytes. Nous avons ainsi montré que les cellules répondent à la présence de facteurs induisant la différenciation cardiaque par une expression massive de marqueurs cardiaques. Nous avons également cultivé les cellules hES en bioréacteur et montré que ce procédé permet une homogénéisation des cellules en différenciation.

La disponibilité d'un modèle d'étude au long terme permettant le suivi des cellules greffées en terme de survie, migration, prolifération et différenciation, associé à des cellules obtenues à partir de cellules hES en nombre et en pureté raisonnables, nous permettra de valider les premières étapes d'études *in vitro* et *ex vivo*, avant de poursuivre les études *in vivo* dans des modèles de la pathologie.

Abstract :

Cardiomyopathy is a frequent occurrence in muscular dystrophy. There is no treatment for cardiomyopathy associated with Duchenne muscular dystrophy and patients, because they tend to be too young to receive a heart transplant. Cardiac cellular therapies are experimental reality and recent advances in this context with stem cells are very hopeful as new therapeutic strategy. Human embryonic stem cells (hESC), because of their self-renew and multiple lineages differentiation properties are the only cells to give rise to cardiomyocytes. Thus, they are the best candidates to cardiac cellular therapy prevent heart failure by either rescuing the host myocardium or regenerating cardiac cells

We have developed an organotypic model of ventricular slices in which tissue structure and functional properties are preserved. In this model, heart slices could beat for several months and were sensitive to administration of chronotrop drugs in the culture medium. Undifferentiated hES cells injected in this model were found in slices up to two months later. Moreover, grafted hES cells showed evidence of cardiac differentiation.

In addition, we have validated the cardiac potential of hES cell lines available in the laboratory. Then, hES cells were submitted to protocols designed to improve cardiac yield. We showed that cells responded to presence of inducing cardiac differentiation factors by strong cardiac markers expression. We also cultivated hES cells in bioreactors and demonstrated that this process allows homogenization of cells in differentiation.

During long term culture model allows the study of survival, migration, proliferation and differentiation of grafted hES cells, combines to hESC-derived cells in reasonable number and purity, will constitute validation of the first steps of *in vitro* and *ex vivo* before *in vivo* studies in pathological models.