

**OBTENTION ET CARACTERISATION D'UNE
POPULATION DE PRECURSEURS CARDIAQUES,
HOMOGENES ET AMPLIFIABLES, POUR SON
UTILISATION EN THERAPIE CELLULAIRE DE
L'INSUFFISANCE CARDIAQUE LIEE A LA
MYOPATHIE DE DUCHENNE**

Alexandra Plancheron

► **To cite this version:**

Alexandra Plancheron. OBTENTION ET CARACTERISATION D'UNE POPULATION DE PRE-CURSEURS CARDIAQUES, HOMOGENES ET AMPLIFIABLES, POUR SON UTILISATION EN THERAPIE CELLULAIRE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE LIEE A LA MYOPATHIE DE DUCHENNE. Biologie cellulaire. 2011. <hal-01478928>

HAL Id: hal-01478928

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01478928>

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Science de la vie et de la terre

Mémoire présenté par

Alexandra Plancheron

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**OBTENTION ET CARACTÉRISATION D'UNE
POPULATION DE PRECURSEURS CARDIAQUES,
HOMOGÈNES ET AMPLIFIABLES, POUR SON
UTILISATION EN THÉRAPIE CELLULAIRE DE
L'INSUFFISANCE CARDIAQUE LIÉE À LA
MYOPATHIE DE DUCHENNE.**

soutenu le

devant le jury suivant :

*Dr Renaud Païtra Flore – Président
Dr Lasbleiz Christelle - Rapporteur
Dr Feraud Olivier - Examineur*

Mémoire préparé sous la direction de :

Laboratoire I-STEM/CECS : Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude de maladies monogéniques.

*Genopôle Campus 1
5 rue Henri Desbruères
91030 EVRY cedex*

*Directeur : Marc Peschanski
Tuteur scientifique : Christelle Monville
e-mail : cmonville@istem.fr*

Et de

Laboratoire E.P.H.E de Pharmacologie Cellulaire (UMRS 872) :

Equipe4 « Différenciation intestinale et métabolisme lipidique »

*Centre de Recherche des Cordeliers
15 rue de l'École de Médecine
75006 PARIS*

*Directeur : Jean Chambaz
Tuteur pédagogique : Sophie Thenet
e-mail : sophie.thenet@crc.jussieu.fr*

I. La myopathie de Duchenne	6
I.1. Génétique de la myopathie de Duchenne.....	6
I.2. Symptômes de la myopathie de Duchenne	6
I.3. Thérapies de la maladie de Duchenne	7
I.3.1. Les thérapies médicamenteuses	8
I.3.2. La thérapie génique.....	9
I.3.3. La thérapie cellulaire.....	10
II. Les modèles animaux	11
II.1. Souris mdx.....	11
II.2. Chien GRMD.....	11
III. Les cellules souches	14
III.1. Propriétés.....	14
III.1.1. Les cellules souches totipotentes.....	14
III.1.2. Les cellules souches pluripotentes	15
III.1.3. Les cellules souches multipotentes	15
III.1.4. Les cellules souches unipotentes.....	16
III.2. Les cellules souches embryonnaires humaines (ou cellules hES).....	16
III.2.1. Législation.....	16
III.2.2. Origine des cellules souches embryonnaires humaines	17
III.2.3. Maintien de la pluripotence des cellules ES humaines en culture	21
III.2.4. Les gènes qui contrôlent la pluripotence.....	25
IV. IV. La thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque.....	26
IV.1. Développement cardiaque in vivo.....	26
IV.2. Différenciation des ES en cellules cardiaques	28
IV.2.1. Généralités	28
IV.2.2. La différenciation guidée vers les lignages mésodermique et cardiaque.....	30
V. Objectifs du travail.....	35
VI. Liste Références Bibliographiques	36

Liste des abréviations

A

AAV: virus associés aux adénovirus

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

ADSC: Adipose Tissue-Derived Stem Cells

ARN: acide ribonucléique

B

BET : bromure d'éthidium

BMD: Dystrophie musculaire de Becker

BMP: bone morphogenic protein

BNP: Brain Natriuretic Peptide

C

CEDS: centre d'élevage du domaine des souches

Cellules ES: cellules souches embryonnaires

Cellules hES (ou CSEh): cellules souches embryonnaires humaines

Cellules iPS: cellules souches induites à la pluripotence

Cellules mES: cellules souches embryonnaires murines

D

DMD: Dystrophie musculaire de Duchenne

DNase : désoxyribonuclase

E

EB: Embryoïd body ou corps embryoïde

ECG : électrocardiogramme

EGF: epidermal growth factor, facteur de croissance épidermique

ENVA: Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

F

bFGF: Facteur de croissance fibroblastique basic

FITC: Fluorescéine Iso Thio Cyanate

Flk1 ou KDR ou VEGFR2: récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial 2

G

GFP: Green Fluorescent Protein

GRMD: Golden retriever atteint de Myopathie de Duchenne

H

HEK: Human Embryonic Kidney

I

ICM: Inner cell Mass

IGF-1: insulin-like growth factor-1

K

KO: knockout

KOSR: knockout serum replacement

L

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

M

hMADS: cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux humain (human Multipotent Adipose-tissue Derived Stem cells)

MAPC: Multipotent Adult Pluripotent Cells

MEF: Mouse embryonic fibroblaste

MDSC: cellules souches dérivées du muscle

N

NGF: facteur de croissance nerve

P

PBS: solution de tampon salin phosphate

PDGF: platelet derived growth factor

Q

Q-PCR ou qPCR: réaction en chaîne par polymérase quantitative

R

Rnase : ribonucléase

Rpm: rotation par minute

RT-PCR: transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase

S

SMAD: Mothers Against Decapentaplegic Drosophila, homologue

SSEA (1/3/4): Stage specific embryonic antigens

STO : dérivées de souris SIM (S: *Sandoz inbred Swiss mouse*), résistants à la 6-thioguanine (T) et l'ouabaïne (O)

SVF: sérum de veau fœtal

T

TDI : Doppler tissu imaging

TGFβ: transforming growth factor

TRA (1-81/1-60): Tumor Rejection Antigens

U

UETM : Unité d'Etude et de Thérapie des Myopathies

I. La myopathie de Duchenne

Décrite en 1860 par le docteur Duchenne de Boulogne, la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), ou Myopathie de Duchenne, est la myopathie la plus fréquente chez l'enfant : elle concerne 1 garçon sur 3500 à la naissance, dont elle cause la mort vers l'âge de 20-30 ans par insuffisance respiratoire ou cardiaque.

I.1.Génétique de la myopathie de Duchenne

La DMD est une maladie génétique à transmission récessive liée au chromosome X (le locus responsable est situé sur le bras court du chromosome X (Xp21.2)), responsable d'une dégénérescence musculaire progressive.

Cette maladie est associée à des mutations affectant, qualitativement et/ou quantitativement, la synthèse d'une protéine associée au cytosquelette appelée dystrophine, protéine présente dans toutes les cellules musculaires et impliquée dans un complexe reliant le cytosquelette à la matrice extracellulaire. Cette protéine est codée par le gène DMD, découvert en 1987 [Hoffman *et al.*, 1987], et son absence entraîne la rupture de ce lien et provoque une fragilisation de la membrane des 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 dans ce genre de maladie.

La dystrophine se décline en deux sous-familles d'isoformes :

- Les 4 isoformes longues de la dystrophine (427kD), très proches, que l'on différencie grâce à la lettre qui indique le lieu où elle se situe (m pour muscle, b pour brain, p pour Purkinje et l pour lymphocytes), elles sont toutes codées par l'exon 1 à 79. Ce sont les isoformes les plus fréquemment touchées dans la DMD.

- Les 4 isoformes courtes qui ne contiennent pas le domaine N-Terminal ni une partie du domaine centrale. Le nom de chaque isoforme indique leur poids en kD : la dystrophine Dp260 qui est située dans la rétine ; la dystrophine Dp140 située dans l'encéphale et le rein ; la dystrophine Dp116 située dans les cellules de Schwann ; et la dystrophine Dp71 qui est ubiquitaire.

I.2. Symptômes de la myopathie de Duchenne

La myopathie de Duchenne touche l'ensemble des muscles de l'organisme, dont le muscle cardiaque.

Un enfant atteint de myopathie de Duchenne ne présente aucun symptôme de la maladie avant l'âge de trois ans.

Le premier symptôme est la marche qui arrive parfois tard, l'enfant tombe assez souvent et se relève difficilement. Des gestes tels que monter des escaliers se révèlent très difficiles, les descendre est plus facile. Progressivement, les muscles des membres et du tronc s'affaiblissent jusqu'à l'impossibilité d'utilisation des membres inférieurs et la limitation de celle des membres supérieurs, vers l'âge de 10-12 ans. Entre-temps, les enfants ont recours occasionnellement au fauteuil roulant jusqu'à 8-9 ans, pour l'adopter définitivement vers les 12-14 ans. Une atteinte des muscles respiratoires rend l'enfant particulièrement sensible aux infections broncho-pulmonaires, ces troubles sont dus à une atteinte des muscles situés entre les côtes et ceux du diaphragme et aux muscles de la nuque, qui diminuent le volume de la cage thoracique. Des troubles cardiaques sont fréquents. La dégénérescence des fibres musculaires entraîne une fibrose (perte d'élasticité des muscles) du ventricule gauche, et donc une diminution des capacités de contraction du cœur et de la quantité de sang éjectée et une accélération du rythme cardiaque (tachycardie). Une atteinte du système nerveux central survient dans 1/3 des cas et se traduit par un retard mental (difficulté à l'acquisition du langage, difficulté de l'apprentissage de la lecture et de l'écriture). L'atrophie des muscles et donc la rétraction des muscles peuvent être suivies d'un enraidissement des articulations, ce qui entraîne une mauvaise démarche (ex : l'enfant a tendance à marcher sur la pointe des pieds à cause de la rétraction du tendon d'Achille).

Une bonne prise en charge de l'enfant lui permet, le plus souvent, d'atteindre l'âge de 20-30 ans.

I.3. Thérapies de la maladie de Duchenne

Même s'il n'existe pas encore de traitement curatif de cette maladie, on peut ralentir son évolution grâce à une prise en charge pluridisciplinaire (orthopédique, respiratoire, cardiaque et nutritionnelle) qui permet à l'enfant de conserver sa qualité de vie en limitant les conséquences de la maladie. Malheureusement, le déficit en dystrophine atteint aussi les cardiomyocytes aboutissant à une perte myocytaire majeure pouvant conduire à l'apparition dès l'adolescence d'un tableau d'insuffisance cardiaque et à une mortalité précoce. Ainsi les scientifiques recherchent, au moyen de la thérapie cellulaire, à traiter ces patients souffrant de cardiomyopathie.

Si ces traitements sont réalisés précocement dans la maladie, ils peuvent permettre aux malades d'atteindre l'âge de 20 ans voire 30 ans. Ces traitements sont :

- les médicaments pour traiter les muscles périphériques mais qui peuvent avoir des effets secondaires.

- la kinésithérapie orthopédique pour améliorer la circulation sanguine, mobiliser les articulations et le fonctionnement actif des muscles. La kinésithérapie respiratoire pour désencombrer les bronches en cas de surinfection pulmonaire.

- la chirurgie, en complément de la rééducation, pour corriger certaines déformations.

- la ventilation pour faciliter la souplesse de la cage thoracique ou pour oxygéner de façon régulière l'organisme. Elle comporte une ventilation nasale de nuit et de jour (qui peut être buccale), voire une trachéotomie.

- les traitements nutritionnels pour éviter les problèmes de déglutition et les fausses routes.

- Aux Etats-Unis et dans certains pays européens, des malades reçoivent des glucocorticoïdes pour améliorer leur force motrice pendant au moins six mois et prolonger la marche pendant deux ans.

Afin de trouver d'autres traitements, des chercheurs ont développés différentes pistes thérapeutiques, médicamenteuses, génétiques et cellulaires, ciblant la maladie à différents niveaux

I.3.1. Les thérapies médicamenteuses

Des essais cliniques de phase II ont été réalisés avec de l'ataluren (ou PTC124), un médicament qui permet au ribosome de passer outre les codons stop prématurés pour la lecture de l'ARN messager et qui permet de restaurer la production de la dystrophine fonctionnelle [Kerem et al, 2008].

Un antibiotique, la gentamycine, peut lui aussi permettre aux ribosomes de passer outre les codons stop prématurés, mais a des effets secondaires indésirables (insuffisance rénale, néphropathies (présence de protéines dans les urines) et des surdités) [Mendell et al., 2010].

Afin de réduire l'inflammation qui entraîne la nécrose des fibres musculaires, les malades peuvent être traités avec des immunosuppresseurs ou des anti-inflammatoires en essais cliniques.

Des essais cliniques de type III, sont réalisés par une société suisse, pour le traitement du stress oxydatif et donc des complications cardiaques et respiratoires de la maladie.

Des essais avec des bêta-bloquants et des inhibiteurs enzymatiques contre les problèmes cardiaques sont en cours.

I.3.2. La thérapie génique

a) Les vecteurs viraux

Un des premiers objectifs consiste à démontrer que le transfert du gène thérapeutique compense le gène défectueux et conduit à une correction fonctionnelle dans un muscle isolé. Les premiers tests ont été évalués sur des modèles animaux (chiens et souris myopathes) en injections intramusculaires d'adénovirus et de vecteurs synthétiques. Les résultats montrent que le transfert local du gène de la dystrophine peut être réalisé dans les deux modèles animaux.

Actuellement, ce sont les vecteurs viraux AAV (virus associés aux adénovirus) qui sont les plus efficaces pour transférer un gène dans un organisme vivant. Par contre, les AAV présentent l'inconvénient de ne pouvoir incorporer que des gènes de petites tailles, or le gène de la dystrophine étant très grand, il faut avoir des mini-gènes de dystrophine, c'est-à-dire une dystrophine plus courte et fonctionnelle.

Un autre inconvénient aux vecteurs AAV est la réponse immunitaire du malade, pour ceci les médecins utilisent des immunosuppresseurs.

b) L'utrophine

L'utrophine est une protéine proche de la dystrophine (80% d'homologie), qui est présente majoritairement avant la naissance. Des recherches sont réalisées afin de voir si une surexpression d'utrophine pourrait remplacer la non-expression de dystrophine [Gillis, 2004].

Les surexpressions stimulées après la naissance ont donné des résultats peu intéressants (chez la souris).

c) Le saut d'exon

La dystrophine n'étant pas exprimée à cause d'une mauvaise lecture de l'ARN messager immature, une autre approche consiste à générer un saut d'exon, pour détourner ce défaut de lecture. Pour induire un saut d'exon, une intervention est réalisée au niveau de la réaction d'épissage de l'ARN, processus par lequel certaines parties non codantes du message génétique – les introns – sont élaguées pour donner naissance à un ARN messager mature, qui constitue le patron de la fabrication de la protéine. Pour faire un saut d'exon, le système d'épissage est trompé pour qu'il supprime non seulement les introns mais également le ou les exons choisis.

Dans le gène de la dystrophine, certains exons ne sont pas indispensables pour que la dystrophine fonctionne. Ce sont ces exons-là que les chercheurs éliminent pour rétablir un "bon" cadre de lecture. Certes, la dystrophine produite est plus courte (quasidystrophine), mais elle est fonctionnelle.

Pour effectuer un saut d'exon, les chercheurs utilisent des petites molécules qui « trompent » la machinerie d'épissage. Ce sont de petits ARN artificiels anti-sens qu'on appelle oligonucléotides anti-sens [Benchaouir et al., 2007 ; Chaouch et al., 2009].

Les avantages du saut d'exon sont : une restauration de l'expression de la dystrophine et des protéines associées, une restauration de l'intégrité membranaire et une récupération d'une résistance à l'effort. Par contre, il y a un risque majeur de réaction immunitaire après les injections et une transformation de la DMD en BMD (Dystrophie Musculaire de Becker).

I.3.3. La thérapie cellulaire

Le but de cette thérapie est de remplacer les cellules mortes ou inefficaces par des cellules saines. Deux approches sont possibles :

- Soit en prélevant des cellules atteintes du patient, puis par modification génétique et amplification ces cellules sont rendues « saines » et réinjectées dans l'organe du malade [Quenneville et al., 2006]. Différents types de cellules sont actuellement utilisés dans le but de remplacer les cellules musculaires qui ont dégénéré : les myoblastes, les cellules souches sanguines spécifiques (AC113+), les hémangioblastes, les cellules souches dérivées du muscle (MDSC), les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules souches adipeuses (hMADS) ;

- soit en greffant des cellules d'un donneur. Pour cette approche, différents types cellulaires sont utilisés, les cellules souches adultes (myoblastes : cellules précurseurs du muscle ; cellules souches sanguines spécifiques, mésangioblastes : cellules souches du muscle ; cellules stromales et cellules souches adipeuses) et les cellules souches embryonnaires, qui sont encore à l'état de recherche fondamentale [Péault et al., 2007].

Par exemple pour la thérapie des muscles lisses et squelettiques, la transplantation de myoblastes dans des modèles animaux de DMD ayant donné des résultats prometteurs, des essais cliniques chez l'homme ont été lancés [Tremblay et al., 2009].

Pour la thérapie cellulaire cardiaque, celle-ci repose sur deux mécanismes d'action :

- la myogénèse qui est la reconstitution du muscle cardiaque ou la formation de muscle squelettique strié ;

- l'angiogénèse et la vasculogénèse qui sont respectivement la formation de nouveaux vaisseaux sanguins soit à partir d'un réseau préexistant soit *de novo*. En effet, la thérapie cellulaire d'un tissu abîmé, donc plus ou moins irrigué, doit apporter des cellules contractiles mais aussi des vaisseaux indispensables pour l'amélioration du tissu.

Pour ce faire, différents types de cellules ont été jusqu'à présent utilisés en expérimentation animale ou lors d'essais thérapeutiques.

II. Les modèles animaux

II.1.Souris mdx

La souris mdx (murine X-linked muscular dystrophy) est le plus ancien modèle animal de DMD décrit. [Bulfield *et al.*, 1984]. Cette mutation murine est apparue spontanément dans une lignée C57BL/10 et résulte d'une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène de la dystrophine qui forme un codon stop prématuré. [Sicinski *et al.*, 1989]. Il en résulte une absence de dystrophine complète même si la souris exprime normalement les 4 isoformes courtes contenant l'extrémité COOH terminale.

Le modèle murin, dont le phénotype très modéré s'écarte de la maladie humaine et en limite la validité, reste le modèle de choix en première intention du fait de sa facilité d'emploi et de l'abondance d'outils moléculaires s'y rattachant.

Toutefois, ces souris ne présentent pas de dégénération musculaire car elles ne développent pas de fibrose, un développement excessif du tissu conjonctif, comme les enfants atteints de la maladie de Duchenne, si bien que la régénération l'emporte sur le processus dégénératif causé par la maladie. Le diaphragme des souris mdx possède une histologie semblable aux muscles des patients [Stedman *et al.*, 1991] contrairement à la plupart des autres muscles qui ont une histologie peu affectée par la maladie [Dangain et Vrbova, 1984]. Ce modèle murin ne convient donc pas comme modèle pathologique pour nos études.

II.2.Chien GRMD

Un autre modèle de la DMD est le modèle canin GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) qui est considéré comme le plus adéquat pour servir de support aux essais thérapeutiques. La mutation GRMD est une mutation spontanée isolée aux Etats-Unis. Les premiers cas de myopathie héréditaire du Golden Retriever ont tout d'abord été observés par De Lahunta en 1973 sur deux chiots mâles de la même portée [De Lahunta *et al.* 1973]. Un cas similaire avait été décrit dans la littérature en 1958 par Meier [Meier H, 1958]. L'affection

canine, décrite pour la première fois par Valentine et ses collaborateurs en 1986 sur une colonie créée à partir d'un chien mâle Golden Retriever adulte, comprenaient des individus de petit (croisés Beagle) et de grand formats (croisés Retriever) [Valentine et al., 1986; Cooper et al., 1990]. Kornegay et ses collaborateurs en 1988, grâce aux croisements d'un mâle malade avec des femelles saines et en procédant à des croisements en retour, ont démontré la transmission de la maladie sur un modèle récessif lié au chromosome X. Au niveau moléculaire, la même équipe a démontré l'absence de dystrophine et de son transcrite chez le chien GRMD [Kornegay et al., 1988; Cooper et al., 1988]. Contrairement à la souris, son phénotype clinique est très similaire à celui de la maladie humaine et se traduit par des modifications précoces de la démarche, une amyotrophie, une faiblesse musculaire progressive associée à une fibrose responsable d'ankylose articulaire et d'anomalies caractéristiques de la posture, ainsi que par des troubles cardiaques digestifs et respiratoires [Chetboul et al., 2004]. L'ensemble de ce tableau clinique le positionne comme un modèle indispensable pour la réalisation d'essais précliniques. Depuis sa découverte, de nombreuses études ont permis d'éclairer la pathogénie de la maladie chez le chien et ont contribué à la validation de marqueurs du dysfonctionnement musculaire. Cependant, il y a besoin d'une bien plus large batterie de tests combinant des paramètres anatomiques, biochimiques, histologiques, physiologiques et mécaniques pour évaluer objectivement et raisonnablement les thérapies testées chez le chien.

Enfin, Sharp et ses collaborateurs ont identifié la mutation ponctuelle au niveau de l'extrémité 3' du site d'épissage de l'intron 6 du gène de la dystrophine [Sharp et al., 1992]. La mutation est de type non-sens, elle déplace le cadre de lecture et introduit un codon-stop prématuré dans l'exon 8. L'ARN messager qui en résulte est tronqué, délété de l'exon 7. Il est présent en très petite quantité, ce qui peut être imputable à une instabilité du transcrite, à un défaut dans le métabolisme intranucléaire durant la transduction ou encore au fait que l'exon délaité se situe très près de l'extrémité 5' du transcrite [Baumann et al., 1985]. Il s'agit du premier exemple de déficience en dystrophine due à une mutation sur un site d'épissage. Le chien possède l'isoforme Dp390 de la dystrophine qui est la plus proche de l'isoforme Dp427 de la dystrophine humaine.

Le chien GRMD est cliniquement, organiquement et génétiquement le modèle animal le plus proche de l'affection humaine. La similitude clinique est maximale chez les chiens mâles ; les femelles homozygotes présentent à partir de trois mois des signes cliniques, mais qui sont moins prononcés que chez les mâles [Valentine et al., 1988]; les femelles porteuses sont quasiment asymptomatiques. [Cooper et al., 1990].

Comparativement à l'atteinte humaine, la dystrophie musculaire canine est d'apparition plus brutale, l'évolution, très rapide la première année, est suivie chez les chiens qui survivent d'une période de relative stabilité clinique pouvant durer plusieurs années, ce qui n'est pas décrit chez l'enfant [Partridge, 1991]. La variabilité du phénotype est plus grande que chez l'enfant, en raison de l'existence de la forme néonatale fulminante de l'anomalie chez les chiens, ce traduisant par la mort des animaux avant l'âge de quinze jours [Partridge, 1993]. Cette anomalie cardiaque est accompagnée d'une modification hormonale, l'augmentation de BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) aussi présente chez l'homme [Cittadini et al., 2004]. Cette hormone est produite par les ventricules cardiaques et joue un rôle physiopathologique d'hormone de stress sécrétée par les ventricules cardiaques dans de nombreuses pathologies cardiaques [Valli et al., 2001]. En revanche, peu de données histologiques sont disponibles, même si l'on sait que ces chiens présentent de larges zones de fibroses, voire de calcification, et cela très tôt dans le développement de la pathologie [Valentine et al., 1989 ; Chetboul et al., 2004a; Yugeta et al., 2006].

Le chien GRMD présente l'atteinte myocardique la plus proche de celle observée chez l'enfant au cours de la dystrophie musculaire de Duchenne : il est un des rares modèles animaux à offrir la possibilité d'étudier les différentes thérapies à visée cardiaque [Moise et al., 1991].

Le modèle canin est intéressant dans au moins deux perspectives :

La première est la compréhension de la pathogénie des dystrophinopathies. La constatation d'une variabilité phénotypique importante chez des chiens dystrophiques présentant tous le même génotype suggère que des facteurs indépendants de la mutation génétique (par exemple, l'exercice musculaire) interviennent dans l'expression clinique de la maladie [Valentine et al., 1992].

La deuxième perspective est la mise au point d'une thérapie génique, consistant à rétablir l'expression musculaire de dystrophine. Pour cela, différents vecteurs sont utilisés, notamment viraux, qui véhiculent tout ou partie du gène DMD. Le modèle canin permet d'évaluer la faisabilité de ces différentes techniques dans des muscles qui possèdent une taille comparable à ceux des enfants souffrant de myopathie de Duchenne. De plus, les lésions étant similaires dans les deux espèces, le modèle canin permet de prédire quelle sera l'efficacité de la thérapie génique dans un muscle où la fibrose est importante et la régénération faible. Enfin, la dystrophinopathie du chien s'accompagnant de signes cliniques marqués, facilement mesurables, elle autorise une évaluation clinique de l'efficacité du traitement testé.

Les avantages du modèle GRMD sont :

- l'existence de colonies de chiens bien établies, aux Etats-Unis, en Australie et en France ;
- la très grande similitude avec la dystrophie musculaire de Duchenne ;
- le format des animaux, comparable avec celui des enfants dystrophiques susceptibles d'être l'objet d'une thérapie.

Les inconvénients du modèle GRMD résident dans :

- le prix des animaux ;
- le faible nombre de portées par chienne et par an, associée à la mortalité néonatale élevée ;
- la difficulté d'entretien d'animaux faibles, dysphagiques, insuffisants respiratoires et cardiaques.

III. Les cellules souches

Le terme de cellules souches désigne des cellules indifférenciées qui, d'une part, ont la capacité à engendrer des cellules spécialisées en se différenciant (cellules cardiaques, musculaires, osseuses, endothéliales, sanguines etc.) et, d'autre part, peuvent se multiplier quasi infiniment à l'identique (auto-renouvellement) notamment en culture.

III.1. Propriétés

Concernant la thérapie cellulaire de la DMD, la recherche actuelle consiste donc en l'évaluation des cellules les plus à même d'améliorer la fonction cardiaque, en fonction de leur effet, de leur disponibilité et des problèmes éthiques posés.

Ainsi les cellules souches pourraient se différencier, ou provoquer par effet paracrine la différenciation de cellules du tissu cardiaque, en cardiomyocytes, en myocytes striés.

Les cellules souches, selon leur potentiel de différenciation, peuvent être classées en 4 catégories:

III.1.1. Les cellules souches totipotentes

Ces cellules totipotentes peuvent reconstituer un organisme complet, ce sont les cellules de l'embryon des premières divisions de l'ovule fécondé.

III.1.2. Les cellules souches pluripotentes

Ces cellules pluripotentes donnent naissance à des cellules issues des 3 feuillets embryonnaires. Ce sont les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh ou hESC pour *human embryonic stem cells*). Ces cellules ont donc pour avantage leur différenciation « physiologique » en tous les types cellulaires adultes, y compris les cardiomyocytes [Thomson *et al.*, 1998].

III.1.3. Les cellules souches multipotentes

Ces cellules multipotentes se différencient en différents types cellulaires. Mais elles sont toutes issues d'une même lignée embryonnaire, engagées dans la voie mésodermique en ce qui concerne les cellules utilisables pour la thérapie cellulaire cardiaque :

- les cellules souches de la moelle osseuse constituées de cellules souches hématopoïétiques, régénérant les lignées sanguines, et des cellules souches mésenchymateuses au potentiel de différenciation osseux, cartilagineux, musculaire voire cardiaque *in vitro* [Giodano *et al.*, 2007] ;
- les cellules de cordon ombilical : ces cellules sont isolées par un tri cellulaire provenant du sang de cordon ombilical [Ma *et al.*, 2006] ;
- les cellules du tissu adipeux brun : ces cellules sont isolées par un tri cellulaire provenant de la zone interscapulaire [Yamada *et al.*, 2006] ;
- les cellules souches mésenchymateuses : ces cellules ont été isolées à partir de ponctions de moelle osseuse. Elles ont le potentiel de se différencier en tissus mésenchymateux, adipocytaire, chondrocytaires et ostéocytaires [Pittenger *et al.*, 1999] ;
- les cellules souches épithéliales amniotiques : ces cellules sont isolées à partir de la membrane amniotique de placenta. Elles peuvent se différencier en cellules hépatiques, cardiomyocytaires ou neurales [Díaz-Prado *et al.*, 2010] ;
- les cellules souches fœtales, obtenues à partir de tissus fœtaux prélevés entre 5 et 9 semaines à la suite d'interruptions volontaires de grossesse [Vescovi *et al.*, 1999 ; Bachoud-Levi *et al.*, 2006] ;
- les MAPCs (Multipotent Adult Pluripotent Cells) : cellules présentant un potentiel plus vaste que les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses, ces cellules ont été isolées par un tri de cellules provenant de culture primaire de moëlle. Elles peuvent se différencier *in vivo*, et *in vitro* en cellules spécifiques (cellules de la lignée neuroectodermique, en neurones spécifiques...) [Reyes *et al.*, 2001] ;

- les ADSCs (Adipose Tissue-Derived Stem Cells).

Les MAPCs et les ADSCs sont aussi souvent appelées cellules souches adultes car elles sont encore présentes dans l'organisme après le stade embryonnaire.

III.1.4. Les cellules souches unipotentes

Ces cellules unipotentes, ou monopotentes, donnent naissance à un seul type de cellules. Par exemple les myoblastes, précurseurs des myocytes striés.

III.2. Les cellules souches embryonnaires humaines (ou cellules hES)

III.2.1. Législation

La recherche sur l'embryon humain est, par principe, interdite en France. A titre dérogatoire et pour cinq ans, la loi de bioéthique du 6 août 2004 permet cependant la réalisation de recherches à finalité thérapeutique dans des conditions extrêmement contrôlées. Les chercheurs autorisés peuvent travailler sur des lignées de hES dérivées à partir d'embryons surnuméraires, conçus dans le cadre d'une fécondation *in vitro*, que les parents choisissent de céder à la recherche. Ces travaux de recherche sont strictement encadrés par l'Agence de la Biomédecine qui s'assure à chaque étape de leur conformité avec le cadre légal et les règles éthiques.

Le décret n° 2006-121 du 6 février 2006 relatif à la recherche sur l'embryon et sur les cellules embryonnaires et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires), précise que, par dérogation et pour une période limitée à cinq ans à partir du présent décret, « *les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques* ». Il permet aux chercheurs de travailler sur des lignées de cellules souches embryonnaires humaines issues d'embryons surnuméraires conçus *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation sur le territoire français et sur des lignées de cellules importées de pays étrangers et créées dans les mêmes conditions. Le laboratoire ISTEM (Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques) a bénéficié de la première autorisation, par l'Agence de la Biomédecine, d'importation en France de lignées de hES provenant de l'étranger conformément au dispositif législatif actuel. Inspecté en 2007, ISTEM a bénéficié d'un rapport entièrement favorable sans demande de modifications, tant pour ses installations, ses procédures que pour le respect de ses engagements de projet.

III.2.2. Origine des cellules souches embryonnaires humaines

a) Provenance et historique des cellules hES

Les cellules hES ont été isolées en 1998 [Thomson *et al.*, 1998]. Avant cela les premiers travaux sur les cellules ES avaient eu lieu en 1981 chez la souris [Evans et Kaufman, 1981; Martin, 1981] et le primate en 1995 [Thomson *et al.*, 1995]. La découverte de ces cellules avait été précédée par l'étude des cellules carcinomiques embryonnaires issues des tératocarcinomes rencontrés en pathologie animale et humaine [Martin et Evans, 1975]. Les hES sont des cellules souches présentes dans l'embryon au stade de développement dit de blastocyste (5 à 7 jours après fécondation). Elles sont obtenues à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste. Elles sont isolées et cultivées à l'état indifférencié. *In vitro*, selon des protocoles de différenciation bien définis, les hES ne peuvent pas donner naissance à un organisme entier mais sont capables de se différencier en cellules des trois feuillets primitifs qui sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme.

Le protocole de dérivation décrit par Thomson et Reubinoff consiste à obtenir des cellules à partir des embryons obtenus par fécondation *in vitro* [Reubinoff *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1998]. 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 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 réimplantation 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 bFGF (facteur de croissance fibroblastique basic) 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 *et al.*, 2003].

Les lignées de cellules 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* [Reubinoff *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1998], les lignées récemment dérivées vont au-delà de 100 passages [Mateizel *et al.*, 2006]. La stabilité à long

terme est une caractéristique importante qu'il faut contrôler. En effet, 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 *et al.*, 2004], mais il a aussi été détecté une certaine instabilité récurrente des chromosomes 12, 17 et 20 dans certaines conditions qui stressent les cellules hES telles que l'utilisation d'enzyme pour dissocier les cellules lors de passages [Brimble *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2004; Lefort *et al.*, 2008].

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.

- 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 (voir descriptifs dans le paragraphe II-2.5).

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 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).

b) Les 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 *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 *et al.*, 2001]. Chez l'homme, la faisabilité de la technique doit être encore démontrée, et les problèmes éthiques soulevés ralentissent les recherches, même si les défenseurs du transfert nucléaire contestent le fait que cette technique soit du 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 causale d'une pathologie, sont utilisées dans des études de modélisation pathologique ou encore pour du criblage de médicaments. En ce qui concerne le transfert nucléaire, cette pratique est interdite en France.

5) de cellules induites à la pluripotence (ou iPS : « *induced-pluripotent stem* »).

Cette technique consiste à reprogrammer des fibroblastes par surexpression des gènes du maintien de la pluripotence (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc). Chez l'homme, les cellules iPS 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 feuillets embryonnaires *in vitro* et pouvaient former des tératomes [Takahashi *et al.*, 2007].

Depuis les premiers travaux, des améliorations dans le protocole permettent d'augmenter le rendement en colonies ES-like, et de diminuer le nombre de vecteurs introduits. Aujourd'hui des chercheurs peuvent reprogrammer des iPS avec seulement trois facteurs (Nanog, Oct4 et Sox2) [Li *et al.*, 2010] en n'utilisant plus les facteurs oncogènes c-Myc et Klf4. Il est possible d'obtenir des cellules iPS à partir de différents types de cellules somatiques différenciées, par exemple à partir de la peau [Greenbaum, 2010]. Enfin, il est possible de différencier les iPS dans différents lignages notamment le lignage cardiaque [Schenke-Layalnd *et al.*, 2008 ; Pfannkuche *et al.*, 2010].

Ces approches de reprogrammation permettent d'autre part d'aborder la compréhension des mécanismes du maintien de la pluripotence, et, au niveau épigénétique, les mécanismes mis en œuvre pour les changements de conformation de la chromatine, ainsi que les gènes impliqués. De manière très intéressante, 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 *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 de combiner thérapies génique et cellulaire en procédant à une recombinaison homologue dans des cellules ES issues de blastocystes obtenus par transfert nucléaire [Rideout et al., 2002]. Les perspectives thérapeutiques autologues sont donc envisageables, si tant est que les problèmes de tumorigénicité puissent être résolus.

Mais ces travaux préliminaires ne permettent pas encore 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 des différents 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. Par introduction de cellules iPS dans des blastocystes murins, des souris chimères ont été obtenues [Nakagawa et al., 2008]. Parmi ces chimères, une certaine proportion développait des tumeurs. Cette tumorigénicité 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, avec une efficacité réduite mais une spécificité accrue, avec une tumorigénicité visiblement réduite sur la période étudiée [Nakagawa 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. D'autres équipes cherchent comment relancer la reprogrammation avec de petites molécules pour moduler les voies de signalisation de l'expression de ces gènes qui ne sont plus exprimés dans les cellules somatiques depuis qu'elles ont quitté le stade embryonnaire.

Un autre avantage pour la thérapie cellulaire, 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 et al., 2008]. Ainsi, on peut 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.

III.2.3. Maintien de la pluripotence des cellules ES humaines en culture

a) Culture des cellules hES

Il est important de considérer l'utilisation finale des cellules hES afin d'en définir les conditions optimales de culture. Ces conditions seront différentes si les cellules sont destinées à être utilisées comme source pour la thérapie cellulaire ou comme modèle d'étude du développement. L'application thérapeutique nécessite, par exemple, des conditions de culture ne contenant aucune protéine xénogène. Cependant un prérequis incontournable est la mise au point de conditions de culture permettant le maintien des cellules ES dans un état pluripotent. En effet, leur culture à l'état indifférencié reste très difficile, et les conditions utilisées par les différents laboratoires sont très variées.

Les cellules hES sont très sensibles à la qualité du tapis de cellules nourricières, du sérum ou de la technique de passage. La modification de ces conditions entraîne des variations significatives de la qualité des cultures. La différenciation spontanée des cellules hES rendent en effet leur culture très délicate. Ainsi les cultures sont hétérogènes, composées à la fois d'une population de cellules pluripotentes et d'une autre population de cellules en voie de différenciation. Par ailleurs, de nombreuses publications montrent que chaque équipe « personnalise » ses conditions de culture. Afin de dériver et de maintenir en autorenouvellement des cellules hES plus facilement, les conditions optimales de culture doivent être mieux définies et standardisées. Ceci permettra d'établir des cultures plus reproductibles pouvant être maintenues dans de multiples laboratoires. Ces conditions de culture idéales devront inclure une matrice définie, un milieu défini supplémenté de protéines recombinantes et une technique de repiquage qui permettra l'ensemencement des cellules à une densité constante. De plus, ces conditions devront permettre aux cellules de conserver un caryotype et un phénotype stables, et la capacité de se différencier de façon reproductible et appropriée.

b) Milieu de culture

La pluripotence et l'auto-renouvellement sont intimement liés, la pluripotence des cellules hES s'accompagnant de leur auto-renouvellement. En cas de différenciation, les cellules hES perdent leur capacité de prolifération spontanée.

Afin de conserver la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules, le milieu de culture des cellules souches embryonnaires doit être changé quotidiennement, ce milieu est un des paramètres fondamentaux dans la culture des cellules hES. La technique comprend différents éléments fondamentaux pour les cellules ES :

- un milieu de culture complété d'un analogue de sérum pouvant comporter des protéines d'origine animale ;
- des « *feeders* » d'origine humaine ou animale, la plupart du temps des cellules embryonnaires fibroblastiques. Ils sont appelés ainsi car « ils nourrissent » les cellules par leurs sécrétions composées de facteurs de croissance ;
- des facteurs de croissance exogènes dont l'effet vise à maintenir la pluripotence : bFGF pour les hES et LIF pour les mES (voir paragraphe matériel et méthodes) ;
- des « passages » (changement de boîtes de culture) tous les 3 à 6 jours pendant lesquels des séparations d'îlots de cellules doivent être effectués afin d'éviter leur confluence lors de la propagation pour ne pas induire de différenciation prématurée.

Les cellules hES peuvent être maintenues en autorenouvellement dans un certain nombre de conditions différentes [Amit et al., 2004, P De Miguel, 2010]. Cependant, il est difficile de comparer les résultats obtenus par différents groupes parce que chaque équipe utilise des milieux de bases, des matrices, des lignées cellulaires et des passages différents. Un autre point important impliquant les différentes voies de régulation de l'autorenouvellement et de la pluripotence, est la courte période, entre deux passages, pendant laquelle les cellules hES sont maintenues dans les conditions reportées. Des protocoles plus spécifiques doivent être élaborés et suivis à long terme avant de pouvoir dresser des conclusions définitives sur le rôle potentiel de diverses molécules de signalisation. Bien que les cellules hES se maintiennent en culture dans de telles conditions, on peut toujours se demander si ces conditions sont vraiment optimales. L'évaluation et la comparaison des différents rapports concernant les conditions de culture déjà testées pourront permettre d'élucider les voies de signalisation requises par les cellules hES indifférenciées, et donc les conditions de culture optimales requises pour les maintenir dans l'état pluripotent. Par ailleurs, l'étude du profil transcriptionnel et les technologies d'analyses de l'expression des gènes (SAGE : Serial Analysis of Gene Expression) ont identifié plusieurs gènes enrichis dans les cellules hES, et notamment des gènes codant pour des molécules exprimées dans les voies de signalisation.

Depuis la dérivation des premières cellules hES, les milieux de culture des cellules hES tendent à ne plus être composés que de produits d'origine humaine afin d'éviter tout risque de zoonose. La reproductibilité des cultures passe également par la suppression ou l'uniformisation des composantes variables des cultures : sérums, « *feeders* ».

Des modes de culture inappropriés risquent également de favoriser l'apparition d'anomalies caryotypiques, malignes ou non, de diminuer le potentiel de prolifération cellulaire ou encore d'induire une différenciation non désirée.

Ainsi les milieux n'incluent plus que rarement du sérum de veau foetal (SVF) qui faisait partie des milieux de culture des cellules ES animales et de la première lignée humaine en 1998. Certaines équipes prônent l'utilisation de milieux sans *feeders*. Un milieu « conditionné », recueilli en présence de feeder a ainsi été utilisé, mais il a été démontré que son utilisation s'accompagne d'anomalies caryotypiques [Maitra et al., 2005 ; Josephson et al., 2006].

c) Matrices extracellulaires et substrats

La culture des cellules hES nécessite un substrat approprié. En effet, les nombreux articles indiquent que les cellules hES ne peuvent être cultivées et maintenues dans un état indifférencié à long terme que sous des conditions particulières impliquant des tapis nourriciers (*feeders*) tels que les MEF (« Mouse embryonic fibroblastes ») ou des fibroblastes embryonnaires humains [Camarasa et al., 2009]. Les *feeders* originaux composés de MEF sont de plus en plus remplacés par des fibroblastes embryonnaires humains. D'autres cellules humaines sont parfois utilisées, fibroblastes cutanés ou encore cellules adultes de la moëlle [Buckingham et al., 2005], des matrices telles que le Matrigel, lame basale obtenue à partir d'un sarcome de souris EHS (*Engelbreth-Holm-Swarm*) [Ludwig et al., 2006] composée de laminine, de collagène IV, d'entactine, de protéoglycane héparane sulfate, de différents facteurs de croissance tels que le bFGF, les EGF (facteur de croissance épidermique), l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1), le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), le NGF (facteur de croissance neural) et le TGF β . La laminine (purifiée à partir du placenta humain ou à partir des tumeurs de souris EHS), la fibronectine (extraite du plasma humain, bovin ou murin), avec toutefois un sérum de remplacement contenant des protéines animales [Buckingham et al., 2005] associées à du milieu de culture conditionné par les MEF [Amit et al., 2000; Amit et al., 2004; Rosler et al., 2004] permettent également le maintien des cellules hES en autorenouvellement [Amit et al., 2004; Xu et al., 2001]. L'utilisation de ces matrices, qui représente une avancée notoire dans la manipulation des cultures de cellules hES, permet de s'affranchir des MEF et rend ainsi la culture des hES plus simple. Bien que l'utilisation du Matrigel soit une avancée considérable, elle nécessite tout de même l'ajout de milieu conditionné par les MEF. De plus, la concentration des différents substrats composant le Matrigel reste indéfinie et la qualité du Matrigel varie d'un lot à l'autre. Il est d'ailleurs

difficile de savoir si les populations de cellules hES maintenues sur ces différents types de substrats sont vraiment équivalentes.

Le retrait du substrat approprié entraîne la différenciation des cellules hES [Xu *et al.*, 2001].

d) Passages

L'adhésion des cellules hES entre elles, bien que critique pour le maintien des interactions intercellulaires, entraîne des difficultés pour repiquer les cellules de manière constante et pour standardiser les conditions de culture. Il existe deux techniques principales de repiquage : mécanique ou enzymatique.

Le repiquage mécanique désagrège les colonies qui sont ensuite transférées dans une nouvelle boîte de culture. Bien que les cultures puissent être maintenues indéfiniment de cette façon, cette méthode de repiquage génère des amas de cellules de taille variable et provoque une distribution cellulaire non homogène. Cette technique concerne plus précisément les cellules hES, pour lesquelles le maintien des cellules en agrégats est indispensable pour garder la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules.

Le repiquage enzymatique implique d'incuber les cellules en présence d'enzymes pour permettre leur dissociation partielle, afin de conserver les cellules en amas de petites tailles. Les réactifs typiques, comme la collagénase de type IV et la trypsine, sont aussi des protéines xénogènes. Bien que la dissociation permette une dispersion plus homogène et une meilleure adhérence des cellules ES, le repiquage constant des cellules de cette manière peut engendrer des aneuploïdies [Brimble *et al.*, 2004]. Cette technique est utilisée pour les cellules mES ou des lignées hES dérivées par cette technique (ex : Hues24).

Quelle que soit la technique de repiquage (mécanique ou enzymatique), il est important que les cellules hES restent en amas pour préserver la pluripotence. Cette situation rend difficile l'obtention de cultures avec une densité constante au fur et à mesure des passages.

e) Facteurs de croissance

Le bFGF, en remplacement du LIF qui était utilisé pour les cellules souches de souris, a été jusqu'à présent utilisé pour les cellules hES afin de conserver l'état de pluripotence des cellules souches embryonnaires [Xu *et al.*, 2005]. Il est utilisé seul, ou avec Noggin pour maintenir la pluripotence des cellules hES. Le mécanisme d'action du bFGF n'est pas entièrement compris, mais il comprendrait une inhibition de l'effet des BMP et d'autres membres de la famille du TGF β . Après liaison avec son récepteur membranaire, il active la voie Ras-Raf-MAPK, comme second messenger, qui conduit des phosphorylations intra-

cytoplasmiques. Les protéines SMAD, notamment SMAD 1 [Sapkota *et al.*, 2007] et SMAD 2 [Massaque, 2003], sont alors phosphorylées empêchant leur accumulation dans le noyau et leurs effets sur la transcription de l'ADN. Il est intéressant de voir qu'il y a une sécrétion autocrine et paracrine de bFGF par les cellules hES indifférenciées, qui expriment alors Oct4 [Dvorak *et al.*, 2005]. Si cette sécrétion est inhibée les cellules hES se différencient rapidement, montrant l'effet du bFGF sur le maintien de leur pluripotence. Les origines de la sécrétion du FGF et le mécanisme par lequel il inhibe la fonction des SMAD ne sont à l'heure pas élucidés.

III.2.4. Les gènes qui contrôlent la pluripotence

Trois protéines semblent être au centre du processus régissant la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules ES. Ce sont OCT4 (également appelé 3 ou Oct3/4), Nanog et Sox2, trois facteurs de transcription exprimés par les cellules totipotentes et pluripotentes [Friel *et al.*, 2005].

Oct4 est le produit du gène Pou5f1, un facteur de transcription à homéodomaine possédant un domaine POU (PIT/OCT/UNC). 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 *et al.*, 2003]. Il est exprimé un peu plus tôt que Nanog et semblerait contrôler le devenir du stade embryonnaire Morula (J4 de l'embryon) en fonction de son niveau d'expression. La baisse de son expression est associée à la formation du trophoctoderme, alors que son augmentation est associée à la formation de l'endoderme et au mésoderme [Pesce et Schöler, 2001]. D'après une revue récente, il apparaît qu'OCT4 n'est pas limité à ce rôle et participerait à l'engagement dans des voies de différenciation mésodermique cardiaque [Stefanovic et Pucéat, 2007]. Chez la souris, l'augmentation du taux d'expression d'Oct4, sous l'effet du TGF β , s'accompagne de celle des gènes cardiaques. *A contrario*, l'inhibition d'Oct4 au stade du blastocyste provoque des malformations cardiaques chez l'embryon [Zeineddine *et al.*, 2006].

Sox2 (de la famille de protéines SOX) tire son nom de SRY (Sex determining Region on Y)-box, nommée ainsi à cause du domaine HMG (High Mobility Group) qu'elle possède et qui est très semblable à celui de SRY, le gène clé de la différenciation des gonades en testicules chez les embryons mâles. Sox2 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de transcription et de structure de la chromatine [Pevny *et al.*, 1997 ; Avilion *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.

Oct4 et Sox2 font partie du cocktail de quatre gènes utilisés par James Alexander Thomson ou par Shinya Yamanaka pour leurs expériences de reprogrammation de cellules adultes en cellules souches pluripotentes [Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007].

Nanog (du celtique « Tir nan Og » qui signifie « pays de l'éternel jeune ») est quant à lui exprimé plus tard, dans l'ICM (Inner Cell Mass) et l'épiblaste avant sa différenciation en endoderme et mésoderme où son expression est réprimée. Les cellules adultes expriment encore faiblement Nanog, alors qu'Oct4 n'est plus du tout exprimé [Hart et al., 2004]. L'inhibition de Nanog induit une différenciation dans les embryons humains [Hyslop et al., 2005]. Cette différenciation ne peut être contrebalancée par une hyper expression d'Oct4, et inversement. Il en ressort qu'Oct4 et Nanog auraient des effets parallèles et complémentaires. Par contre, le fonctionnement précis de ces deux gènes n'est pas parfaitement connu du fait d'effets dépendant vraisemblablement de leurs taux stœchiométriques, de la variété des facteurs de croissance présents, de la chronologie de leur expression et des effets parfois croisés de ces facteurs.

IV. IV. La thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque

IV.1. Développement cardiaque in vivo

De l'ovulation à l'implantation il se passe 6 jours. L'ovocyte fécondé devient œuf, ou zygote, puis commence sa segmentation dans la trompe, du stade de deux cellules à celui de 32 à 58 cellules au 3^{ème} ou 4^{ème} jour, appelé morula, avant de devenir le blastocyste libre, ou blastocyste pré-implantation au 5^{ème} jour qui n'a plus le caractère « compacté » de la morula mais présente une cavité cerclée du trophoblaste avec une masse cellulaire appelée bouton embryonnaire (ou ICM pour Inner Cell Mass). C'est à ce dernier stade que l'embryon fécondé est utilisé pour l'insémination utérine en fécondation *in vitro*. Les cellules souches embryonnaires humaines et animales proviennent de l'ICM présente à ce stade particulier [Drews, 1994].

L'implantation a ensuite lieu entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour lors de la pénétration de la muqueuse utérine par le trophoblaste. Les cellules de l'ICM vont se différencier dans les trois feuilletts embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, mais pas dans les annexes placentaires. Cette notion est un peu remise en question actuellement puisque les cellules trophoblastiques ont été obtenues à partir des cellules hES en présence de BMP4

(*Bone Morphogenic Protein 4*) et de bFGF (ou FGF2: facteur de croissance fibroblastique basique) [Xu C *et al.*, 2002] mais avec une faible prolifération et sans autre expérience identique concluante par une autre équipe.

Dès lors, plusieurs étapes vont s'enchaîner : disque embryonnaire didermique par différenciation au pôle supérieur (ectoderme et endoderme), disque tridermique avec l'apparition du mésoderme entre les deux couches déjà présentes. La migration latérale du mésoderme entre le trophoblaste et le sac vitellin (provenant de l'endoderme) donne le mésoderme extra-embryonnaire qui, migre d'une part vers le placenta et d'autre part vers le canal vitellin, deux structures retrouvées dans le conduit ombilical. L'endoderme suit également cette migration pariétale et viscérale [Drews, 1994]. Le sac vitellin est le siège de la première hématopoïèse fœtale, couplée à une angiogénèse, se déroulant dans le mésoderme. Ce dernier donne aussi la moëlle osseuse et le système musculo-squelettique par le biais des somites.

L'organogénèse cardiaque débute par la formation de la cavité cœlomique, se développant en péricarde par la suite, entre les deux feuilletts du mésoderme. La compréhension classique de la cardiogénèse a été récemment complétée par des expérimentations chez les mammifères (souris, poulets) [Buckingham *et al.*, 2005] qui ont précisé l'existence de deux sources de cardiomyocytes, les champs cardiaques primaire et secondaire (« heart fields ») dans le mésoderme embryonnaire.

Chacun des deux champs a une participation majoritaire dans la formation des structures définitives du cœur [Srivastava, 2006]. Le champ primaire donnerait le ventricule gauche et les oreillettes, alors que le secondaire donnerait le ventricule droit et les voies d'éjections cardiaques. L'induction de la cardiogénèse dans le mésoderme se fait par les signaux cellulaires de l'endoderme attendant par le biais, entre autres, des facteurs de croissance (ou cytokines) Wnt (*wingless/int*), BMP (*bone morphogenic protein*) et bFGF qui activent les facteurs de transcription cardiaque et mésodermique, Gata4 (Gata-Binding protéine 4: facteur de transcription à doigts de zinc), Nkx2.5 (facteur de transcription à homéodomaine), Tbx6, Tbx5 et Tbx 20 (facteurs de transcription au domaine T) dans les cellules mésodermiques [Pandur, 2005]. Ces mêmes facteurs de croissance et de transcription sont utilisés dans la culture à tropisme cardiaque des cellules ES.

L'utilisation des cellules ES, notamment de souris, a permis de comprendre certains des mécanismes régulateurs de l'embryologie générale et cardiaque [Loebel *et al.*, 2003]. Les coopérations entre endoderme et mésoderme, par le biais des sécrétions de cytokines influant sur le tissu voisin (BMP et TGF β : *transforming growth factor*), ont ainsi un rôle prépondérant dans la cardiogénèse. Ces cytokines ne sont pas retrouvées dans le neuro-ectoderme. La chronologie, les facteurs déclenchants et les concentrations de ces cytokines ne sont pas exactement connus.

L'utilisation de cellules adultes, ou fœtales (cellules du sang de cordon), dans les tentatives de différenciation cardiaque se base sur une origine mésodermique commune et l'existence de progéniteurs communs avec les cardiomyocytes. Les seules cellules capables comme les cellules adultes et fœtales de donner des cellules différenciées dans une voie précise sont les cellules hES.

IV.2. Différenciation des ES en cellules cardiaques

IV.2.1. Généralités

a) 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.

b) La différenciation spontanée

Celle-ci a été observée en périphérie et au centre des colonies [Reubinoff *et al.*, 2000], mais le phénomène le plus évident reste la formation de colonies sphéroïdes ou 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 les trois feuilletts embryonnaires. Former des corps embryoïdes à partir de cellules hES est un processus peu reproductible en termes de nombre et taille. 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 *et al.*, 2000]. Cette étude montre, en recherchant des marqueurs précoces spécifiques des différents feuilletts embryonnaires, 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, des cellules β -pancréatiques et des cardiomyocytes. 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.

c) 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 embryoides 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. Tous ces traitements précédemment décrits peuvent être appliqués sur des monocouches cellulaires et/ou sur des EB en suspension, selon le protocole utilisé. 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 qu'une simple transposition. Cependant, il existe des différences notables entre les cellules souches embryonnaires murines et humaines [Ginis *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 [Li *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2004; Perrier *et al.*, 2004 ; Reubinoff *et al.*, 2001], des cellules de type îlots de Langerhans [Rambhatla *et al.*, 2003; Stamp *et al.*, 2005; Segev *et al.*, 2004], des cellules hépatiques [Rambhatla *et al.*, 2003; Stamp *et al.*, 2005], des ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes et des adipocytes [Barberi *et al.*, 2007] et des cardiomyocytes [He *et al.*, 2003; Kehat *et al.*, 2001; Mummery *et al.*, 2002]. Néanmoins, 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 obtenir certains types cellulaires, comme les cellules de muscles squelettiques.

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.

IV.2.2. La différenciation guidée vers les lignages mésodermique et cardiaque

a) Les facteurs de croissance

Des facteurs de croissance sont utilisés afin d'induire la différenciation, comme les différents membres de la superfamille du TGF β (comme BMP2 ou 4 notamment, activin, nodal etc.)

Les membres de la superfamille du TGF β agissent en se liant à un récepteur membranaire de type sérine/thréonine kinase hétéromérique composé de 2 sous unités, I et II. Leur second messager est une famille de protéines nommée SMAD (Mothers Against Decapentaplegic Drosophila, homologue) qui transloque du cytoplasme au noyau où elle se lie par le biais de cofacteur à l'ADN afin d'induire sa transcription. Activin et Nodal activent les SMAD 2 et 3, les BMP activent les SMAD 1, 5 et 8 alors que le TGF β peut potentiellement tous les activer. Les gènes-cibles des BMP sont des gènes inhibiteurs de la différenciation (Id pour « inhibitors of differentiation »). La complexité de ces mécanismes, multiplicité des cofacteurs, des inhibiteurs, des gènes et interactions avec d'autres facteurs de croissance font que les différentes publications sur le sujet n'ont pas trouvé un effet univoque sur les cellules hES.

Pour ce qui est de leurs effets les plus reproductibles, les BMP et le TGF β ont montré dans des études *in vivo* chez les vertébrés (poulet et souris) un effet sur la différenciation cardiaque avec absence de cœur ou malformation cardiaque s'ils sont inhibés [Kinder *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2000]. *In vitro*, le TGF β entraîne une différenciation mésodermale et cardiaque dans les corps embryoides (ou EB) murins.

Un effet identique des BMP2 et 4 a été retrouvé sur les cellules hES et les cellules ES de souris : l'inhibition de la différenciation en neuroectoderme, partie de l'ectoderme donnant ensuite le tube neural [Pera *et al.*, 2004], effet inhibé par Noggin (inhibiteur spécifique des BMP). L'effet ostéogénique et chondrogénique des BMP est bien sûr à signaler, car il a permis leur utilisation en pratique orthopédique humaine comme adjuvants en cas de pertes de substance osseuse, à des posologies toutefois beaucoup plus élevées que celles utilisées pour la différenciation cardiaque [Chen *et al.*, 2004].

Une différenciation préférentielle en cardiomyocytes des cellules hES, cultivées en EB en présence de BMP2 a été démontrée [Pal et Khanna, 2007]. Cette étude a exclusivement été menée *in vitro* en présence de sérum (SVF). Finalement, les effets divergent selon les

conditions expérimentales (avec ou sans sérum...), mais les membres de la famille du TGF β semblent être un facteur-clé pour l'induction de la différenciation dans les tissus embryonnaires mésodermiques, avec des conséquences différentes selon l'environnement cellulaire.

b) Les protocoles de différenciation

C'est en 2001 que les premiers cardiomyocytes ont été obtenus à partir de cellules hES par Kofidis et ses collaborateurs. Des cellules hES ont été mises en suspension pour s'aggréger afin d'obtenir des EB, ces derniers sont ensuiteensemencés et l'observation microscopique de zones « battantes » ont permis de mettre en évidence la présence de cardiomyocytes [Kehat *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 rendent ce protocole insatisfaisant. Xu et ses collaborateurs ont alors imaginé isoler les cellules battantes par une séparation au travers d'un gradient au Percoll [Xu *et al.*, 2002]. D'autres ont misé sur une technique de co-culture pour s'affranchir de la formation de corps embryoides trop hétérogènes pour permettre un bon rendement en cellules d'intérêt. Le groupe de Christine Mummery utilise des cellules 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 *et al.*, 2002]. Récemment, les travaux de Michel Pucéat ont montré que lorsque des cellules souches embryonnaires murines étaient cultivées en présence de BMP2 et de TGF β , pendant 24h avant la mise en EB, le potentiel de différenciation cardiaque était augmenté avec plus de zones battantes et une meilleure myofibrogénèse [Behfar *et al.*, 2002]. Plus récemment, ces résultats ont été reproduits à partir de cellules souches embryonnaires humaines [Tomescot *et al.*, 2007]. 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 connus pour avoir un effet positif sur la différenciation cardiaque [Sauer *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. Heng et ses collaborateurs rapportent aussi les inconvénients de chaque méthode abordée [Heng *et al.*, 2004]. 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). Jusqu'à maintenant, aucun consensus n'est 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 sont 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 *et al.*, 2005]. Sachant que l'enrichissement permet d'obtenir 15% de cardiomyocytes et que le nombre de cellules perdues lors d'un infarctus est d'environ 1 milliard chez l'homme, il est difficile d'imaginer utiliser cette méthode en clinique, sans compter le fait que les populations cellulaires obtenues après centrifugation du Percoll ne sont pas pures, et que le risque de conserver des cellules encore indifférenciées est majeur.

Pour caractériser les cellules différenciées, les données du développement cardiaque nous permettent de déterminer les molécules à identifier. De plus, 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 d'une cellule cardiomyocytaire isolée, le profil du potentiel d'action et l'influence de différentes drogues [Reppel *et al.*, 2004].

b.1) Protocoles de recherche de progéniteurs cardiaques.

Des tentatives d'obtention de progéniteurs cardiaques à partir de cellules ES se sont appuyés sur l'observation que Flk1 (ou VEGFR2 : récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial 2 ou KDR pour l'homme) a été détecté dans les cellules mésodermiques de l'embryon, dans une région amenée à devenir le cœur [Yamaguchi *et al.*, 1993]. Les hémangioblastes et les progéniteurs cardio-vasculaires expriment Flk1 [Nishikawa *et al.*, 1998] mais aussi Brachury (Bry), marqueur du mésoderme précoce [Fehling *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 *et al.*, 2005; Kouskoff *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2005 ; Kattman *et al.*, 2006].

Selon les approches, les cellules triées sont soit ré-ensemencées sur OP9 (cellules stromales issues de cellules de la moelle osseuse de souris) [Yamashita *et al.*, 2005], soit ré-agrégées puis retriées [Kouskoff *et al.*, 2005]. 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 *et al.*, 2005; Kouskoff *et al.*, 2005; Yamashita *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 *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 des cellules n'exprimant pas Flk1 [Kouskoff *et al.*, 2005; Kattman *et al.*, 2006].

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.

Récemment, Michel Pucéat a démontré que la population CD15⁺ (correspondant à SSEA1, marqueur de l'indifférenciation chez la souris) constitue une population de progéniteurs cardiaques chez l'homme. Cette population est facilement triable et amplifiable, elle exprime tous les marqueurs cardiaques précoces (Tbx5/6/20, Mef2c et Nkx2.5) [Pucéat, 2008; Leschik *et al.*, 2008].

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 résoudre en plus de ceux inhérents aux cellules hES évoqués précédemment et ceux survenant lorsque l'on envisage une application de thérapie cellulaire au niveau clinique (*feeder* notamment).

b.2) Optimisation des conditions afin d'utiliser les cellules ES en thérapie cellulaire

La dérivation et les conditions de culture initiales utilisées pour les cellules hES exposent ces dernières à des composants xénogènes présents dans le milieu de culture ou le tapis nourricier. Le milieu de culture contient de forte quantité de SVF (sérum de veau fœtal) ou de KOSR (Knock Out Serum Replacement). Bien que le KOSR contienne moins de composants xénogènes que le SVF, sa composition reste non définie et sa formulation, composée d'albumine de sérum bovin, est protégée et donc inaccessible. L'utilisation de cellules ES exposées à des composants xénogènes entraîne donc le risque d'infections par des pathogènes. Par ailleurs, un acide sialique non humain, le Neu5Gc, présent dans les cellules hES cultivées en milieu KOSR et sur MEF, entraîne une réponse immunitaire avec des anticorps spécifiques anti-Neu5G, présents dans la plupart des sérums humains [Martin *et al.*, 2005]. Bien que ce travail ait été effectué sur une seule lignée cellulaire, il soulève la nécessité « d'humaniser » les conditions de culture des cellules hES.

Des progrès ont été réalisés concernant l'élimination de composants xénogènes des milieux de culture de dérivation des cellules hES. Ainsi, plusieurs équipes ont dérivé des lignées de cellules hES en utilisant des cellules nourricières humaines [Hovatta *et al.*, 2003; Lanzendorf *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004]. Simon et ses collègues ont récemment rapporté la dérivation de cellules hES dans des conditions présentées comme dépourvues de protéines animales [Simon *et al.*, 2005]. Cependant, le milieu utilisé pour cette dérivation contenait 20% de KOSR et cette lignée a donc également été exposée à une certaine quantité de protéines animales. Par ailleurs, un certain nombre de composants des cultures de cellules hES restent non définis, comme certains substrats et plusieurs enzymes. La prochaine étape importante sera donc la dérivation de cellules hES dans un milieu strictement défini et dépourvu de toute contamination par des protéines non humaines.

V. Objectifs du travail

Le traitement des dystrophies musculaires par thérapie cellulaire ou thérapie génique nécessite une approche systémique afin de toucher l'ensemble de la musculature.

Le but de la thérapie cellulaire dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne, qui est la thérapie du laboratoire, est de transplanter des cellules embryonnaires humaines différenciées en progéniteurs spécifiques qui vont s'intégrer aux fibres musculaires atteintes.

Les travaux présentés dans ce diplôme abordent deux approches visant à traiter les patients DMD par la thérapie cellulaire.

La première partie consistait en l'étude d'optimisation d'un protocole d'obtention et de caractérisation d'une population de précurseurs cardiaques, homogènes et amplifiables à partir des cellules souches embryonnaires murines.

La seconde partie consistait à tester l'utilisation de ce précurseur cardiaque en thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque liée à la Myopathie de Duchenne dans son modèle animal, le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), afin de réparer cette insuffisance et réparer ce tissu cardiaque atteint.

Malgré les progrès considérables réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire et cellulaire, l'extrême difficulté à développer des thérapies directement applicables à l'homme nécessite le recours à des modèles animaux.

VI. Liste Références Bibliographiques

A

Allamand V, Campbell KP (2000). Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet.* 9(16):2459-67.

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 227(2), 271-8

Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 70(3):837-45

Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J (2004) Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 70(3), 837-45

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17(1):126-40.

B

Bachoud-Lévi AC, Gaura V, Brugières P, Lefaucheur JP, Boissé MF, Maison P, Baudic S, Ribeiro MJ, Bourdet C, Remy P, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M (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.

Barberi T, Bradbury M, Dincer Z, Panagiotakos G, Socci ND, Studer L (2007). Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 13(5), 642-8

Baumann B, Potash MJ, Köhler G (1985). Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *Embo J* 4(2), 351-9

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Pucéat M (2002). Stem cell differentiation requires a paracrine pathways in the heart. *Faseb J* 16(12), 1558-66

Behfar A, Perez-Terzic C, Faustino RS, Arrell DK, Hodgson DM, Yamada S, Puceat M, Niederländer N, Alekseev AE, Zingman LV, Terzic A (2007). Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *J Exp Med.* 204(2):405-20.

Bel A, Planat-Bernard V, Saito A, Bonnevie L, Bellamy V, Sabbah L, Bellabas L, Brinon B, Vanneaux V, Pradeau P, Peyrard S, Larghero J, Pouly J, Binder P, Garcia S, Shimizu T, Sawa Y, Okano T, Bruneval P, Desnos M, Hagège AA, Casteilla L, Pucéat M, Menasché P (2010). Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation* 122 (11 Suppl):S118-23.

Bell J (2004). Predicting disease using genomics. *Nature*; 429(6990):453-6.

Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, Bellamy V, Rücker-Martin C, Barbry P, Bel A, Bruneval P, Cowan C, Pouly J, Mitalipov S, Gouadon E, Binder P, Hagège A, Desnos M, Renaud JF, Menasché P, Pucéat M (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest.* 120(4):1125-39. doi: 10.1172/JCI40120.

Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, Luo Y, Liu Y, Lyons IG, Freed WJ, Robins AJ, Rao MS, Schulz TC (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, Meilhac S, Zaffran S (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6(11), 826-35

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(4), 1189-92

Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A. (2004). Karyotype of human ES cells during culture. *Nat Biotechnol* 22(4), 381-2; author reply 382

C

Camarasa M, Brison D, Kimber SJ, Handyside AH (2009). Naturally immortalised mouse embryonic fibroblast lines support human embryonic stem cell growth. *Cloning Stem Cells* 11(3):453-62.

Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22(4):233-41.

Cittadini A, Ines Comi L, Longobardi S, Rocco Petretta V, Casaburi C, Passamano L, Merola B, Durante-Mangoni E, Saccà L, Politano L (2004). A preliminary randomized study of growth hormone administration in Becker and Duchenne muscular dystrophies. *Eur Heart J*. 25(2):183.

Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, et al. (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334(6178), 154-6

Cooper BJ, Gallagher EA, Smith CA, Valentine BA, Winand NJ (1990). Mosaic expression of dystrophin in carriers of canine X-linked muscular dystrophy. *Lab Invest* 62 (2), 171-178

Coulombel L (2003). Cellules souches tissulaires adultes: seing is not being. *M/S: médecine sciences* 19(6-7): 683-94.

Chetboul V, Escriou C, Tessier D, Richard V, Pouchelon JL, Thibault H, Lallemand F, Thuillez C, Blot S, Derumeaux G (2004). Tissu doppler imaging detects early asymptomatic myocardial abnormalities in a dog model of Duchenne's cardiomyopathy. *Eur Heart J* 25(21), 1934-9

D

Dangain, J, Vrbova G (1984). Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve* 7(9), 700-4

De Lahunta A, Sandefeldt E, Cummings JF, De Lahunta A, Björck G, Krook L (1973). Hereditary neuronal abiotrophy in the Swedish Lapland dog. *Cornell Vet.* 63, Suppl 3:1-71

Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ (2010). Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *J Cell Biochem* 111(4):846-57.

Dimmeler S, Leri A (2008). Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res.* 102(11):1319-30.

Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA (2005). Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res.* 67(2):301-7.

Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultures human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22(1), 53-4

Dreux (1994). Atlas de poche d'embryologie, Flammarion médecine-sciences, Paris

Dunwoodie SL (2007). Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction, lineage specification and chamber formation. *Semin Cell Dev Biol.* 18(1):54-66.

Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, Vodinska M, Najvirtova M, Krekac D, Hampl A (2005). Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23(8), 1200-11

E

Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819), 154-6

F

Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G, Kouskoff V (2003). Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 130(17), 4217-27

Friel R, Van der Sar S, Mee PJ (2005). Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Adv Drug Deliv Rev* 57(13), 1894-903

Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, Barton PJ, Terracciano CM, Yacoub MH, Suzuki K (2007). Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation* 115(17):2254-61.

G

Gersh BJ, Simari RD, Behfar A, Terzic CM, Terzic A (2009). Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clin Proc* 84(10):876-92.

Gillis JM. (2004) « Guérir la myopathie de Duchenne par l'utrophine ? ». *M/S : médecine sciences*, vol. 20, n° 4, p.442-447.

Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, Rao MS (2004). Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269(2), 360-80

Giordano A, Galderisi U, Marino IR (2007). From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cell. *J Cell Physiol* 211(1), 27-35

Greenbaum LE (2010). From skin cells to hepatocytes: advances in application of iPS cell technology. *J Clin Invest.* 120(9):3102-5.

H

Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, Bel A, Puymirat E, Peyrard S, Agbulut O, Menasché P (2009). Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg.* 87(4):1196-203.

Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn* 230(1), 187-98

He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93(1), 32-9

Heng BC, Haider HKh, Sim EK, Cao T, Ng SC (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res* 62(1), 34-42

Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 51(6), 919-28

Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andäng M, Ahrlund-Richter L (2003). A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod*. 18(7), 1404-9

Hudson W, Collins MC, De Freitas D, Sun YS, Muller-Borer B, Kypson AP (2007). Beating and arrested intramyocardial injections are associated with significant mechanical loss: implications for cardiac cell transplantation. *J Surg Res.*; 142(2):263-7.

Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M (2005). Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23(8),1035-43

I

Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H, Nakahata T(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, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6(2), 88-95

J

Josephson R, Sykes G, Liu Y, Ording C, Xu W, Zeng X, Shin S, Loring J, Maitra A, Rao MS, Auerbach JM (2006). A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines. *BMC Biol*. 4:28

K

Kattman SJ, Huber TL, Keller GM (2006). Multipotent flk1+ cardiovascular progenitors cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineage. *Dev Cell* 11(5), 723-32

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001). Human embryonic stem can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108(3), 407-14

Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, Guglieri M, Ashton E, Abbs S, Nihoyannopoulos P, Garralda ME, Rutherford M, McCulley C, Popplewell L, Graham IR, Dickson G, Wood MJ, Wells DJ, Wilton SD, Kole R, Straub V, Bushby K, Sewry C, Morgan JE, Muntoni F (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 8(10):918-28.

Kinder SJ, Loebel DA, Tam PP (2001). Allocation and early differentiation of cardiovascular progenitors in the mouse embryo. *Trends Cardiovasc Med* 11(5), 177-84

Kissel CK, Lehmann R, Assmus B, Aicher A, Honold J, Fischer-Rasokat U, Heeschen C, Spyridopoulos I, Dimmeler S, Zeiher AM (2007). Selective functional exhaustion of hematopoietic

progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol* 49(24):2341-9.

Kornegay JN, Tuler SM, Miller DM, Levesque DC (1988). Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 11(10), 1056-64

Kouskoff V, Lacaud G, Schwantz S, Fehling HJ, Keller G (2005). Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(37), 13170-5

L

Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, Muskheli V, Murry CE (2005). Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 167(3), 663-71

Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD (2001). Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril*.76 (1), 132-7

Lefort N, Feyeux M, Bas C, Féraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, Peschanski M, Perrier AL (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol*. 26(12), 1364-6

Leschik J, Stefanovic S, Brinon B, Pucéat M (2008). Cardiac commitment of primate embryonic stem cells. *Nat Protoc* 3(9), 1381-7

Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC (2005). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23(2), 215-21

Li Y, Zhao H, Lan F, Lee A, Chen L, Lin C, Yao Y, Li L (2010). Generation of human-induced pluripotent stem cells from gut mesentery-derived cells by ectopic expression of OCT4/SOX2/NANOG. *Cell Reprogram* 12(3):237-47.

Loebel DA, Watson CM, De Young RA, Tam PP (2003). Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* 264(1), 1-14

Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA (2006). Dérivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24(2), 185-7

M

Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, Piechaczek C, Choi YH, Li W, Steinhoff G, Stamm C (2006). Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 38(3), 771-3

Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui S, Carpenter M, Gazdar AF, Rao M, Chakravarti A (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet.* (10):1099-103.

Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, Al-Dahhak R, Lewis S, Shilling CJ, Kota J, Serrano-Munuera C, Hayes J, Mahan JD, Campbell KJ, Banwell B, Dasouki M, Watts V, Sivakumar K, Bien-Willner R, Flanigan KM, Sahenk Z, Barohn RJ, Walker CM, Mendell JR.(2010) Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 67(6):771-80.

Martin GR and Evans MJ (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(4), 1441-5

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(12), 7634-8

Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med.* 11(2), 228-32

Massague J (2003). Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev* 17(24), 2993-7

Mateizel I, De Temmerman N, Ullmann U, Cauffman G, Sermon K, Van de Velde H, De Rycke M, Degreef E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (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

Meier H (1958). Myopathies in the dog. *Cornell Vet.* 48(3), 313-30

Menasché P. Current status and future prospects for cell transplantation to prevent congestive heart failure (2008). *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 20(2):131-7.

Moise NS, Valentine BA, Brown CA, Erb HN, Beck KA, Cooper BJ, Gilmour RF (1991). Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic and echocardiographic studies. *J Am Coll Cardiol* 17(3), 812-820

Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wining D, Schulz T, Noggle S, Venable A, Lyons I, Robins A, Stice S (2003). Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 21(5), 521-6

Mummery C, Ward D, Van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Opthof T, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, Van der Heyden M, Pera M (2002). Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat* 200(Pt3), 233-42

N

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 26(1):101-6.

Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H (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

O

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006). Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 367(9507), 356-67

P

Pal R and Khanna A. (2007). Similar pattern in cardiac differentiation of human embryonic stem cell lines, BG01V and ReliCell (®) hES1, under low serum concentration supplemented with bone morphogenetic protein-2. *Differentiation* 75(2), 112-22

Pandur P (2005). What does it take to make a heart? *Biol Cell* 97(3), 197-210

- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 451(7175):141-6.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134(5):877-86.
- Park S, Lee KS, Lee YJ, Shin HA, Cho HY, Wang KC, Kim YS, Lee HT, Chung KS, Kim EY, Lim J (2004). Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci Lett* 359(1-2), 99-103
- Partridge T (1991). Animal models of muscular dystrophy – what can't they teach us? *Neuropathol Appl Neurobiol* 17, 353-363
- Partridge T (1993). Pathophysiology of muscular dystrophy. *Br J Hosp Med* 49 (1), 26-35
- P De Miguel M, Fuentes-Julián S, Alcaina Y (2010). Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. *Stem Cell Rev*
- Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 15(5):867-77
- Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Ward-van Oostwaard D, Mummery C (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci* 117(Pt7), 1269-80.
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(34), 12543-8
- Pesce M and Schöler HR (2001). Oct4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19(4), 271-8
- Pevny LH, Lovell-Badge R (1997). Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*. 7(3):338-44.
- Pfannkuche K, Hannes T, Khalil M, Noghabi MS, Morshedi A, Hescheler J, Dröge P (2010). Induced pluripotent stem cells: a new approach for physiological research. *Cell Physiol Biochem*. 26(2):105-24
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-7.
- Pouly J, Hagège AA, Vilquin JT, Bissery A, Rouche A, Bruneval P, Duboc D, Desnos M, Fiszman M, Fromes Y, Menasché P (2004). Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation* 110(12):1626-31.
- Pucéat M (2005). Embryonic stem cells to study early myocardial development and potential regenerative medicine. *M/S: médecine sciences* 21(12):1076-82.
- Pucéat M (2008). Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Methods* 45(2), 168-71

Quenneville SP, Chapdelaine P, Rousseau J, Tremblay JP (2007). Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase. *Gene Ther* 14(6):514-22.

Quinn SM, Walters WM, Vescovi AL, Whittemore SR (1999). Lineage restriction of neuroepithelial precursor cells from fetal human spinal cord. *J Neurosci Res*. 57(5):590-602.

R

Rambhatla, L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK (2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 12(1), 1-11

Reppel, M, Boettinger C, Hescheler J (2004). Beta-adrenergic and muscarinic modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*. 14(4-6), 187-96

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18(4), 339-404

Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19(12), 1134-40

Reyes M, Verfaillie CM (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 938:231-3; discussion 233-5.

Rideout WM 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*. 109(1):17-27.

Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, Carpenter MK (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn*. 229(2), 259-74

S

Sapkota G, Alarcón C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massagué J (2007). Balancing BMP signaling through integrated inputs into the SMAD 1 linker. *Mol Cell* 25(3), 441-54

Sauer, Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001). Reactive oxygen species intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11(4), 173-86

Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J (2004). Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* 22(3), 265-74

Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, et al. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13(1), 115-21

Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S (2000). BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol* 224(2), 226-37

Shimozaki K, Nakashima K, Niwa H, Taga T (2003). Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* 130(11), 2505-12

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244(4912), 1578-80

Simón C, Escobedo C, Valbuena D, Genbacev O, Galan A, Krtolica A, Asensi A, Sánchez E, Esplugues J, Fisher S, Pellicer A (2005). First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. *Fertil Steril*. 83(1), 246-9

Srivastava D (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126(6), 1037-48

Stamp L, Crosby HA, Hawes SM, Strain AJ, Pera MF (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 HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leferovich JM, Sladky JT, Kelly AM (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352(6335), 536-9

Stefanovic S and Pucéat M (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

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 54(3):132-41.

T

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-72.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(17), 7844-8

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts » *Science* 282(5391), 1145-7

Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, Dubois G, Messas E, Bruneval P, Desnos M, Hagège AA, Amit M, Itskovitz J, Menasché P, Pucéat M (2007). Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in post-myocardial infarcted rats. *Stem Cells* 25(9), 2200-5

V

Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, deLahunta A (1986). Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol* 71, 301-310

Valentine BA, Cooper BJ, de Lahunta A, O'Quinn R, Blue JT (1988). Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neuro Sci* 88(1-3), 69-81

Valentine BA, Cummings JF, Cooper BJ (1989). Development of Duchenne-type cardiomyopathy. Morphologic studies in a canine model. *Am J Pathol.* 135(4):671-8.

Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D, Moise NS, de Lahunta A, Kornegay JN, Cooper BJ (1992). Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet* 42, 352-356

W

Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292(5517), 740-3

Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, Clapham DE, Lien CL, Schultheiss TM, Orkin SH (2006). Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell.* 127(6):1137-50.

X

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 19(10), 971-4

Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91(6), 501-8

Xu C, Jiang J, Sottile V, McWhir J, Lebkowski J, Carpenter MK (2004). Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* 22(6), 972-80

Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter MK (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells.* 23(3):315-23.

Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20(12), 1261-4

Y

Yamada Y, Wang XD, Yokoyama S, Fukuda N, Takakura N (2006). Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damage myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 342(2), 662-70

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993). Flk-1 andflt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118(2), 489-98

Yamashita, JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Peishi Y, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa S (2005). Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *Faseb J* 19(11), 1534-6

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318(5858):1917-20.

Yugeta N, Urasawa N, Fujii Y, Yoshimura M, Yuasa K, Wada MR, Nakura M, Shimatsu Y, Tomohiro M, Takahashi A, Machida N, Wakao Y, Akinori Nakamura A and Takeda S (2006). Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. *BMC Cardiovasc Disord* 6: 47.

Z

Zeineddine D, Papadimou E, Chebli K, Gineste M, Liu J, Grey C, Thurig S, Behfar A, Wallace VA, Skerjanc IS, Pucéat M (2006). Oct3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell* 11(4), 535-46

Zhang H, Song P, Tang Y, Zhang XL, Zhao SH, Wei YJ, Hu SS (2007). Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 134(5):1234-40.

Obtention et caractérisation d'une population de précurseurs cardiaques, homogènes et amplifiables, pour son utilisation en thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque liée à la myopathie de Duchenne.

Mémoire présenté par *Alexandra Plancheron*, soutenu le

RÉSUMÉ

La dystrophie musculaire de Duchenne est caractérisée par une faiblesse musculaire progressive et la mort prématurée résultant d'une carence en dystrophine, protéine exprimée dans tous les muscles du corps humain. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement curatif et le déficit en dystrophine, qui atteint entre autres les cardiomyocytes, peut ainsi conduire à l'apparition d'insuffisance cardiaque et à une mortalité précoce.

Les cellules souches embryonnaires (ES) considérées depuis longtemps comme une source possible de cellules cardiaques pourraient permettre de traiter cette pathologie. En effet, en culture, les ES sont capables de se différencier en cardiomyocytes. Ces cellules présentent des caractéristiques phénotypiques similaires à celles des cardiomyocytes adultes. Il semble donc envisageable de transplanter des cellules ES induites *in vitro* vers la différenciation en cardiomyocytes et rigoureusement sélectionnées, chez des patients souffrant de Myopathie de Duchenne.

Dans l'optique d'obtenir une population de précurseurs cardiaques à partir de cellules embryonnaires de souris (mES), nous nous sommes intéressés à deux d'approches, (i) l'une basée sur l'obtention d'une population homogène qui n'exprime pas le marqueur Flk1 (Flk1-), pouvant mener à l'apparition de cardiomyocytes, (ii) la seconde consistant en l'ajout de facteurs (Wnt3a et/ou dkk-1) régulant la voie Wnt, activatrice de la différenciation mésodermique. Les premières expériences ont montré que dans une lignée de mES, la lignée D3, dont on induit la différenciation en cellules cardiaques, l'expression des différents marqueurs de l'endoderme et du mésoderme apparaissent dès trois jours. D'autre part, le tri de la population Flk1- ainsi que l'ajout de Wnt3a à ces mêmes cellules, mène dès quinze jours de différenciation à la formation de cardiomyocytes battants.

La deuxième partie de l'étude a porté sur l'utilisation précurseurs cardiaques, obtenus à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hES), pour la thérapie cellulaire dans un modèle canin de la myopathie de Duchenne. Le chien Golden Retriever dystrophique (chien GRMD) fournit un modèle animal puissant de la myopathie de Duchenne, imitant le phénotype cardiaque humain. Ces animaux développent, très tôt dans la pathologie (à partir de 6 mois), les dysfonctionnements du ventricule associé à une fibrose légère qui dégénère ensuite vers la fibrose calcifiée. Notre objectif était de tester si un tel environnement cardiaque était convenable pour la greffe de cellules progénitrices cardiaques issues de hES. À cette fin, nous avons greffé chez des chiens GRMD des progéniteurs cardiaques dérivés de cellules hES, en utilisant directement l'implantation épicaudique sous immunosuppression. Nous n'avons pas constaté d'amélioration fonctionnelle de ces animaux après greffe et avons retrouvé très peu de cellules humaines. Cela suggère une mort cellulaire des cellules lors de l'injection, ou très tôt après, qui pourrait être due à l'environnement fibreux et calcifié du tissu hôte.

Mots clés: Myopathie de Duchenne (DMD), cellules souches embryonnaires murines (mES) Cellules souches embryonnaires humaines (hES), Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), Transplantation, Thérapie cellulaire.