



Thérapie cellulaire myocardique

Kasra Azarnoush

► To cite this version:

Kasra Azarnoush. Thérapie cellulaire myocardique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2010. Français. NNT : 2010CLF1MM26 . tel-00719631

HAL Id: tel-00719631

<https://theses.hal.science/tel-00719631>

Submitted on 20 Jul 2012

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'Auvergne

Année 2010

N° d'ordre :

**ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité

Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

Soutenue le 25 mai 2010

Azarnoush Kasra

Thérapie cellulaire myocardique

Président :	Monsieur le Professeur Philippe MENASCHE
Directeur :	Monsieur le Professeur Charles de RIBEROLLES
Membre :	Monsieur le Professeur Claude DUBRAY
Membres et rapporteurs :	Monsieur le Professeur Marc LASKAR
	Monsieur le Professeur Alain PRAT

Abréviations :

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé	AFSSAPS
Angioplastie percutanée	ATL
Brain natriurétique peptide	BNP
Cellules souches hématopoïétiques	CSH
Cellules souches mésenchymateuses	CSM
Electrocardiogramme	ECG
Erythropoïétine	EPO
Fraction d'éjection	FE
Granulocyte colony-stimulating factor	G-CSF
Green fluorescent protein	GFP
Human Leukocyte Antigen	HLA
Imagerie par résonance magnétique	IRM
Infarctus du myocarde	IdM
Institut national de la santé et de la recherche médicale	INSERM
Multipotent adult progenitor cells	MAPC
New York Heart Association (classification de la)	NYHA
Polymerase chain reaction	PCR
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA
Programme hospitalier de recherche clinique	PHRC
Rat multipotent adult progenitor cells	rMAPC
Société canadienne de cardiologie (classification de la)	SCC
Tomoscintigraphie par emission mono photonique	TEMP
Tomographie par émission de positron au 18-Fluorodeoxyglucose	TEP au 18 FDG
Ventricule gauche	VG
Volume télé diastolique	VTD
Volume télé systolique	VTs

Plan

I- Historique

II- Généralités et état des lieux

- 1-Définition
- 2-La thérapie cellulaire myocardique : problématique
- 3-Traitement médical de l'insuffisance cardiaque
- 4-Traitement chirurgical
- 5-Etudes de thérapie cellulaire dans le traitement de l'insuffisance cardiaque

III- Les types cellulaires proposés

- 1-Cellules autologues
- 2-Cellules hétérologues
- 3-Voies d'apport du greffon cellulaire

IV- Les travaux personnels de recherche pré-clinique : 2003–2007

- 1-Le choc thermique (chaud ou froid) peut-il améliorer la greffe de myoblastes squelettiques dans le myocarde infarci ?
- 2-Amélioration des bénéfices fonctionnels de la greffe de myoblastes squelettiques par l'administration associée au Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF 1 α)
- 3- Les cellules progénitrices adultes multipotentes dérivées de la moelle osseuse peuvent-elles permettre la régénération du myocarde après un infarctus ?
- 4- L'érythropoïétine peut-elle améliorer la prise de greffe des myoblastes squelettiques après un infarctus du myocarde ?

V- Applications en recherche humaine : Dépôt d'un PHRC en 2007. Protocole accepté et actuellement en cours sur le CHU G. Montpied

VI- Perspectives et valorisation

VII- Conclusion

VIII- Références

IX- Abstracts et articles de la thèse

I- Historique

La transfusion sanguine peut être considérée comme la première « thérapie cellulaire » chez l'homme. Elle fut :

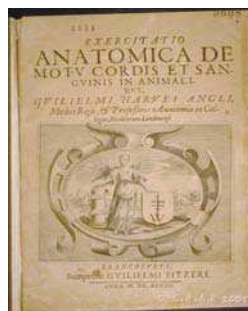
- évoquée dans l'histoire des anciens Egyptiens et le *Traité d'anatomie* d'Hérophile,
- tentée en 1492 par le pape Innocent VIII, qui a bu le sang de trois jeunes garçons, morts dans les suites, suivis de peu par le pape.



Le Pape Innocent VIII

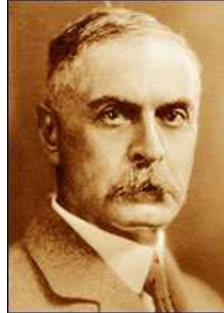
- réussie en 1667, par Jean Baptiste Denis, médecin privé de Louis XIV, qui injecta neuf onces de sang d'un agneau à un jeune homme qui fut définitivement guéri d'une fièvre qui avait résisté à une vingtaine de saignées.

Entre temps (en 1616), William Harvey avait démontré la réalité de la circulation sanguine et l'utilité du sang à transporter « quelque chose ».



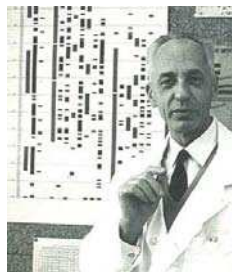
William Harvey « *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* » publié en 1628

Les groupes sanguins sont découverts en 1900 par l'autrichien Karl Landsteiner (prix Nobel en 1930) et la transfusion sanguine, iso groupe, trouve son utilité durant la première guerre mondiale.



Karl Landsteiner

Karl Landsteiner et Alexander Wiener mettent en évidence le groupe Rhésus en 1940 et Jean Dausset (prix Nobel en 1980) découvre le complexe majeur d'histocompatibilité ou le groupe HLA (Human Leukocyte Antigen) en 1958.

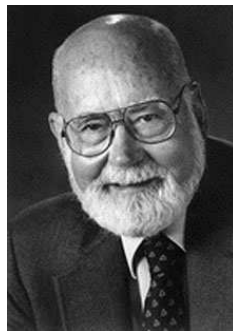


Jean Dausset

La première transplantation d'organe, réussie et rapportée, concerne la cornée. Elle est réalisée en 1905 par Eduard Konrad Zirm, sur un homme de 45 ans. La première transplantation rénale est pratiquée à l'hôpital Necker, en 1952, par l'équipe du professeur Louis Michon et la première transplantation rénale « réussie », deux ans plus tard, entre de vrais jumeaux, par Joseph E. Murray (prix Nobel en 1990). La première transplantation cardiaque est réalisée en 1967 par le professeur Christian Barnard en Afrique du sud (Barnard

1967), chez un patient ayant survécu 18 jours après l'intervention. Les résultats des transplantations d'organe se sont améliorés par l'arrivée de la ciclosporine, découverte en janvier 1972 et utilisée par Norman E. Shumway en complément des drogues anti rejets « plus traditionnelles».

En ce qui concerne la moelle osseuse, la première réussite chez l'homme est réalisée par E. Donnall Thomas en 1957 (Thomas 1957). La thérapie cellulaire, par transplantation de cellules, débute par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Actuellement, elle n'a pas fait de progrès remarquable malgré de nombreuses études expérimentales.



E. Donnall Thomas

La première greffe de sang de cordon est réalisée en 1988 par le professeur Eliane Gluckman (Wagner 2010), à l'hôpital St. Louis.

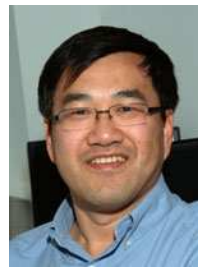


Eliane Gluckman

La thérapie cellulaire myocardique est une des premières applications pratiques de la transplantation de cellules dans un organe différencié. Elle est expérimentée depuis plus de quinze ans, mais les premières publications datent de 1996 avec les publications de l'équipe du professeur Menasché et d'une équipe de l'université de Toronto (Scorsin 1996, Li 1996). La lésion myocardique était provoquée soit par ligature coronaire soit par congélation, pour la transplantation de cardiomyocytes fœtaux.



Philippe Menasché



Ren-Ke Li

II- Généralités et état des lieux

1- Définition

Les produits cellulaires à finalité thérapeutique sont des cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues (c'est-à-dire que le donneur et le receveur sont une même personne) ou allogéniques (le receveur et le donneur sont deux personnes différentes) quelque soit le niveau de transformation, y compris leurs dérivés (définition de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé -AFSSAPS-). La transfusion sanguine est exclue de la définition de thérapie cellulaire. La notion de thérapie cellulaire ne concerne donc que l'apport de produits cellulaires nucléés capables de s'intégrer dans un tissu ou organe avec possibilité de multiplication cellulaire.

Selon l'article L 1211-1 du code de la santé publique : « la thérapie cellulaire concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparation de cellules vivantes humaines ou animales ». En théorie, le greffon cellulaire aide directement ou indirectement à la réparation de tissus endommagés et provoque l'arrivée et la production de facteurs manquant au fonctionnement correct de l'organe.

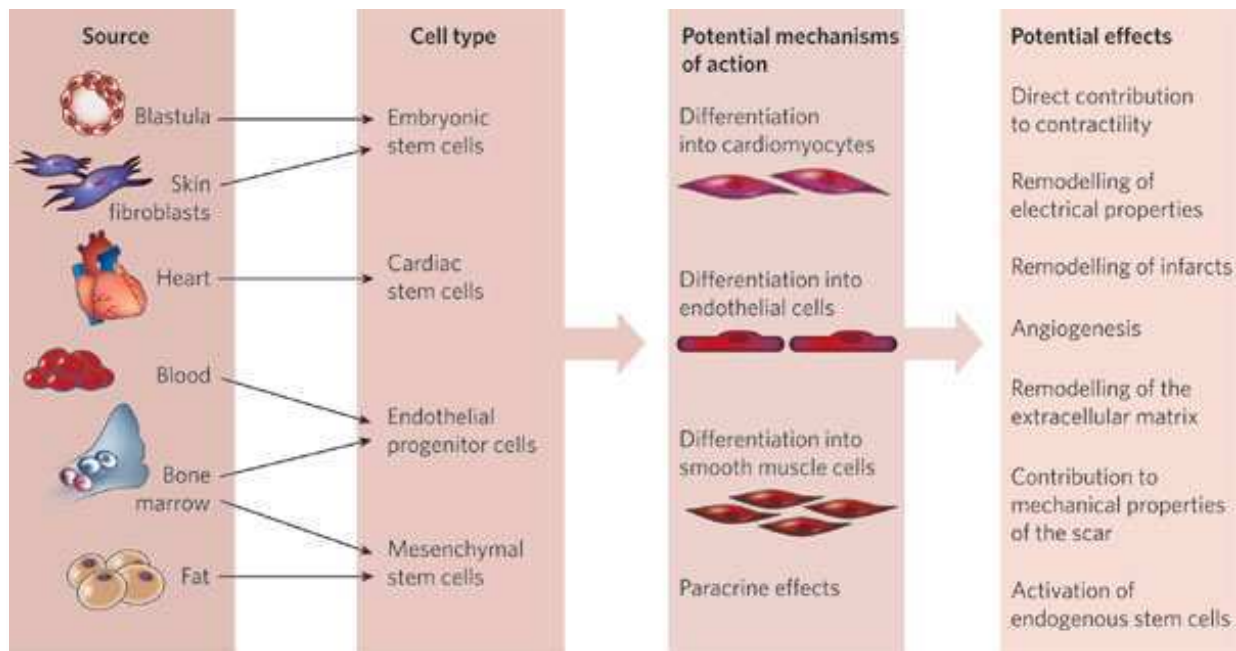
L'action des cellules apportées peut être :

- une réparation
- une substitution
- un apport de tissu de soutien
- une activité hormonale
- une activité autocrine et paracrine

Les éléments apportés peuvent être autologues ou hétérologues, avec apport de :

- cellules différenciées,

- cellules précurseurs, issues des cellules souches avec une notion de différenciation acquise
- cellules souches multipotentes
- cellules souches totipotentes



Stem-cell therapy for cardiac disease : Vincent F. M. Segers & Richard T. Lee. Nature 451, 937-942(21 February 2008)

2- La thérapie cellulaire myocardique : problématique

Comme pour le tissu nerveux, la thérapie cellulaire apparaît comme une des solutions les plus adaptées pour la réparation de lésions myocardiques irréversibles comme l'infarctus, malgré l'existence démontrée d'une division cellulaire des cardiomyocytes après infarctus (Beltrami 2003).

L'insuffisance cardiaque ischémique est un enjeu majeur de santé publique et représente un poids économique non négligeable pour les différents systèmes de santé dans le monde (Butler 2008, Cohn 1997). La prévalence de l'insuffisance cardiaque est estimée à 1 – 2% dans les pays les plus « développés » avec une incidence proche de 1% par an (Mosterd 2007).

De plus, la forte diminution de la mortalité précoce de l'infarctus myocardique grâce au développement des techniques et des stratégies de revascularisation myocardique rapide, conduit un plus grand nombre de patients vers un remodelage myocardique négatif (Pfeffer 1995).

3- Traitement médical de l'insuffisance cardiaque

Plusieurs classes de médicaments ont désormais montré une efficacité non négligeable pour le traitement de l'insuffisance cardiaque : les antiagrégants plaquettaires (Antithrombotic Trialists' Collaboration 2002), les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Yusuf 2000), les bêtabloquants (Dargie 2001), les diurétiques épargneurs de potassium (Iraqi 2009), les statines (López-Cuenca 2010).

L'évolution vers l'insuffisance cardiaque terminale n'est le plus souvent que ralentie par un traitement médical optimisé. La suite de l'évolution naturelle de l'insuffisance cardiaque terminale est le plus souvent la répétition des hospitalisations avec une espérance de vie fortement réduite (Hunt 2009).

4- Traitement chirurgical

La transplantation cardiaque reste le traitement de choix, avec une amélioration significative de la survie des patients (Taylor 2007). Ce traitement n'est actuellement proposé qu'aux patients les plus jeunes, capables de suivre un traitement anti rejet. Le besoin d'un traitement par immunosuppresseurs à vie et la pénurie d'organes limitent encore plus le recours à cette solution « radicale ». Les techniques d'assistance cardiaque mécanique sont également en cours de développement. Elles répondent partiellement aux besoins des patients en attente de transplantation (Copeland 2004) ou comme traitement de longue durée (Siegenthaler 2005).

5- Etudes de thérapie cellulaire dans le traitement de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque terminale était et est encore considérée comme une pathologie « irréversible ». Les thérapies cellulaire et génique myocardiques sont apparues comme des alternatives possibles aux traitements classiques, à l'assistance mécanique et à la transplantation cardiaque. De nombreuses lignées cellulaires sont testées et des modalités différentes de délivrance des produits sont élaborées. Malgré une expérimentation animale riche et des résultats encourageants sur les différents modèles de lésions myocardiques, aucun résultat entièrement satisfaisant n'est encore obtenu. Le nombre de publication sur les différents moteurs de recherche (PUBMED) est passé d'une petite centaine en 2001-2002, avant le début du premier protocole en collaboration avec l'unité de thérapie cellulaire du professeur Menasché à plus de 20.000 articles, dont plus de 1700 consacré uniquement à des essais cliniques chez l'homme.

III- Les types cellulaires proposés

1- Cellules autologues

Les myoblastes squelettiques

Historiquement, ils sont parmi les premières cellules étudiées (Scorsin 1996). La facilité de leur obtention chez l'homme (cellules autologues), les délais faibles de leur culture, leur résistance et multiplication rapide, leur origine musculaire, en ont fait une lignée de choix pour les essais chez l'homme.

Cellules souches de la moelle osseuse :

C'est un compartiment hétérogène, composé de plusieurs populations de cellules souches : les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Piao 2005), les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Orlic 2001), les cellules progénitrices adultes multipotentes (Zeng 2007)...

La notion de transdifférenciation de ces lignées cellulaires, après transplantation, rapportée par la littérature se révèle être fausse (artéfact technique et des phénomènes de fusion cellulaire) (Vieyra 2005, Alvarez-Dolado 2003). Les travaux d'Orlic (Orlic 2001) concernant la régénérescence myocardique après injection directe de CSH ne sont pas confirmés et les cellules greffées n'acquièrent pas de phénotype cardiaque (Scherschel 2008). De même pour les CSM qui n'ont probablement pas d'effet direct sur la réparation du myocarde endommagé, mais des effets indirects, pouvant améliorer la fonction myocardique (Reinecke 2008). Une des pistes à exploiter pour ces lignées, est une induction pré transplantation de ces cellules souches dans la direction désirée. Le traitement par insuline, dexaméthasone et acide ascorbique des CSM fait apparaître de la troponine I et d'autres marqueurs spécifiques des cardiomyocytes (Shim 2004); et un cocktail de culture complexe à base de 5-aza-2'-deoxycytidine pourrait même orienter les SMC vers des cellules battantes avec détection de myosine cardiaque (Shiota 2007).

Cellules souches myocardiques

Les cellules souches cardiaques ont été isolées en 2003 (Beltrami 2003), à l'aide de leur antigène de surface c-kit (Lin^-), chez le rat. Ces cellules peu nombreuses (1 c-kit⁺ cellule pour 10⁴ cardiomyocytes), pourraient se multiplier et se transformer en cellule musculaire lisse, en cardiomyocyte ou en cellule endothéliale. Chez l'homme seulement 0.5 à 2.7 cellules c-kit⁺ sont retrouvées par mm² sur des biopsies de l'oreillette droite et du septum interventriculaire (Pouly 2008). D'autres variétés de cellules souches myocardiques ont également été isolées :

les cellules sca-1⁺, non c-kit (Oh 2003), les cardiosphères, cellules souches battantes (Messina 2004) et les cellules Isl 1⁺ identifiées chez la souris, le rat et l'homme (Laugwitz 2005).

Les cellules souches endothéliales, porteuses des marqueurs Flk-1, CD 34 et CD 133 peuvent se différencier en cellules endothéliales sans démonstration de leur différenciation en cellules contractiles (Gruh 2006).

2- Cellules hétérologues

Cellules souches embryonnaires

Les travaux initiés par Leroy Stevens et Barry Pierce dans les années 1950 (Alexandre 2001) sur l'étude des tératocarcinomes murins ont permis d'isoler les premières cellules souches embryonnaires. Ce sont des cellules multipotentes, dérivées de la partie interne des blastocystes, avant l'implantation de l'œuf. Elles sont isolées chez l'homme depuis 1998 (Thomson 1998). Les cellules souches pluripotentes induites sont proches des cellules embryonnaires. Ce sont des cellules reprogrammées pour exprimer des marqueurs spécifiques de cardiomyocytes (Takahashi 2007). L'utilisation des ces cellules est fortement encadrée et limitée, pour des raisons éthiques évidentes.

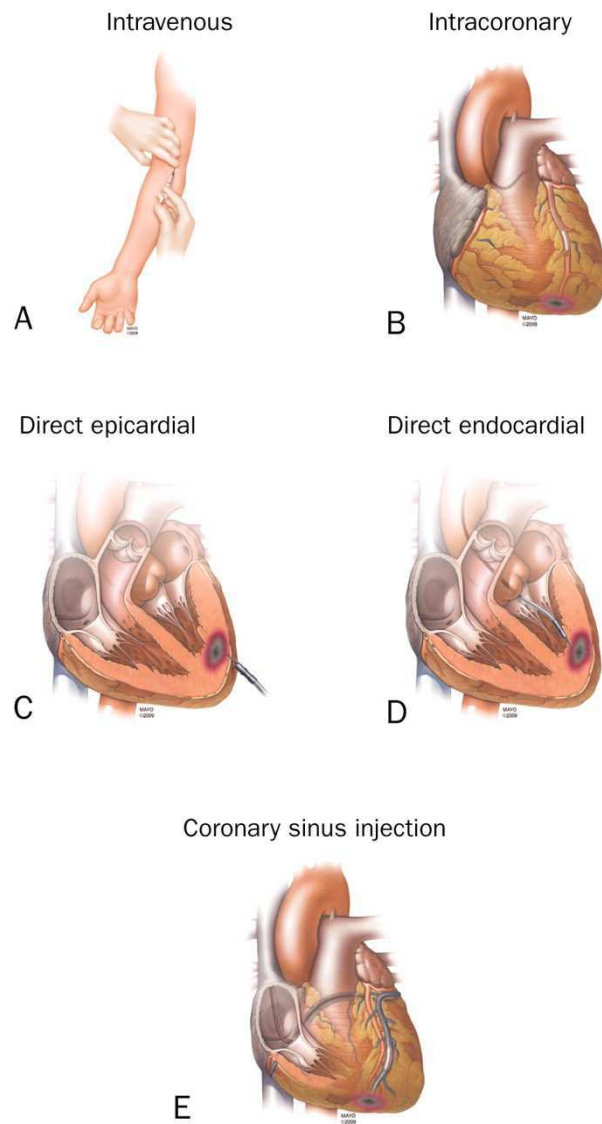
Les cellules souches de sang du cordon ombilical

Le sang du cordon est un milieu hétérogène contenant des cellules avec un potentiel angiogénique et une possible différenciation vers les cellules musculaires (Prat-Vidal 2007). Ses avantages sont nombreux : c'est un milieu riche en cellules souches et cellules progénitrices, facile à obtenir et à cultiver. Il est largement utilisé chez l'homme pour traiter les affections hématologiques et serait utilisable comme greffon myocardique sans immunosuppression (Henning 2004). Ce greffon est également confronté à une mortalité cellulaire élevée après transplantation (Balsam 2004) et, malgré des résultats encourageants

chez le rat (Henning 2004), aucune amélioration n'a été notée sur un modèle porcin (Moelker 2007).

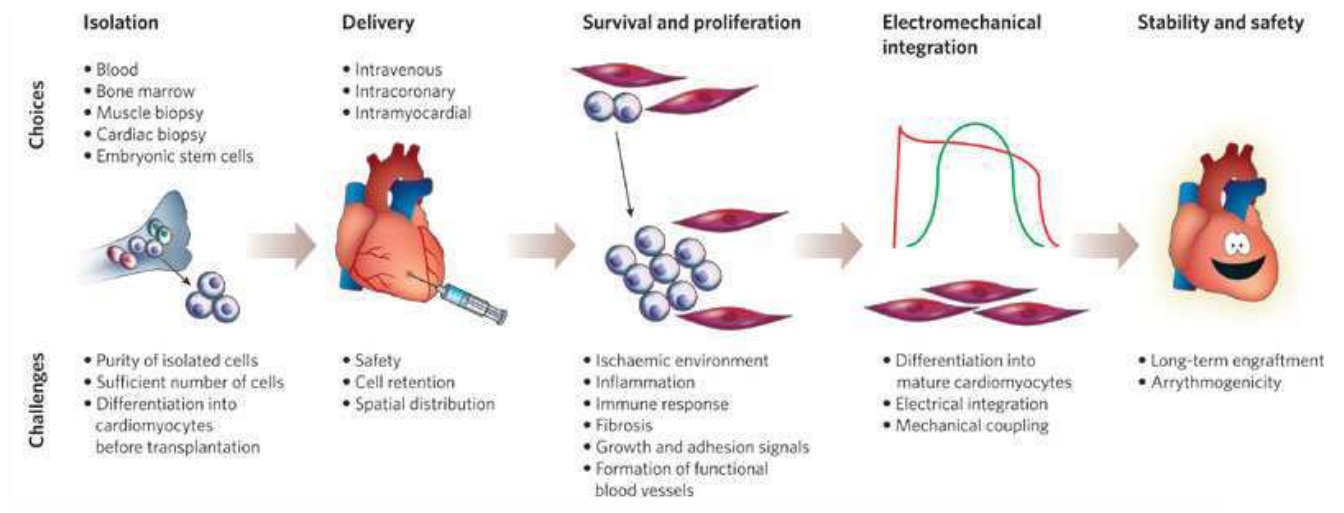
3- Voies d'apport du greffon cellulaire

Les voies de transplantation cellulaire (Dib 2010) sont : La voie intra veineuse, la voie épigastrique, la voie intracoronaire (Khang 2004), la délivrance par le sinus veineux et la voie endocardique. Le choix d'une voie épigastrique s'est naturellement imposé dans l'équipe. Tout d'abord, en laboratoire, la taille et le poids des rats rendent les autres voies inaccessibles; d'autre part, la facilité d'accès au cœur lors des interventions chirurgicales, chez l'homme, en ont fait la principale voie utilisée dans l'équipe.



B. Gersh, R. Simari, A Behfar, C. Terzic, A. Terzic, Cardiac Cell Repair Therapy: A Clinical Perspective. Mayo Clin Proc. 2009;84(10):876-92

Schématisation des différentes étapes de thérapie cellulaire :



Stem-cell therapy for cardiac disease : Vincent F. M. Segers & Richard T. Lee. Nature 451, 937-942(21 February 2008). Chaque étape doit faire l'objet d'une attention particulière et peut mettre en péril tous le processus.

IV- Les travaux personnels de recherche pré-clinique :

2003–2007

Le choix du type cellulaire et du mode de délivrance au sein de l'U633 étant fait : greffe de myoblastes squelettiques par voie épicardique; la problématique principale de l'équipe était de comprendre les mécanismes d'action pour pouvoir améliorer les résultats fonctionnels de la thérapie cellulaire. Deux protocoles conjoints ont été élaborés :

- tester les effets d'un choc thermique sur les myoblastes pour un protocole optimisé de traitement cellulaire pré transplantation
- diminuer l'ischémie dans la zone de délivrance du greffon cellulaire pour améliorer la survie des myoblastes

L'hypothèse de départ est fondée sur les travaux de Zhang (Zhang 2001, Suzuki 2004) sur la mortalité cellulaire après transplantation de myoblastes et de Tambara (Tambara 2003) sur l'importance du nombre de cellules greffées. L'amélioration de la fonction myocardique dépend du nombre de cellules transplantées vivantes, retrouvées à distance de la greffe.

L'augmentation de la résistance des cellules à la transplantation était le but de ce premier travail. L'amélioration de la résistance des cellules à l'apoptose par un choc thermique semblait être une excellente idée : le choc thermique étant un traitement physique, facilement applicable aux myoblastes humains au cours des protocoles d'essai clinique.

Pour toutes les publications citées, tous les animaux sans exception ont été opérés en respectant les principes fondamentaux relatifs aux soins des animaux de laboratoire.

Apport personnel pour ce travail, publié : *Transplantation. 2005 Sep 15;80(5):660-5* (cf chapitre IX) :

- chirurgie et anesthésie de tous les animaux opérés
- injections quotidiennes de ciclosporine et soins courants sur toute la durée du protocole
- préparation et culture cellulaire
- préparation des échantillons après sacrifice des animaux
- collecte des données
- participation à l'analyse des données et à la rédaction finale de l'article

Collaborations et aides pour l'élaboration du projet :

- Agnès Maurel : collaboration active pour toutes les manipulations en laboratoire et expertise en culture de cellules, PCR, Western blot...
- Alain Hagège et Laurent Sabbah : cardiologues référents de l'étude pour les échocardiographies
- Alvine Bissery : analyse statistique
- Chantal Mandet, Patrick Bruneval : préparation des lames et analyse histologique
- Professeur Philippe Menasché : Directeur du travail et véritable référent, du début jusqu'à la finition complète. Aide et soutien intellectuel, financier, logistique, psychologique et rédactionnel

1- Le choc thermique (chaud ou froid) peut-il améliorer la greffe de myoblastes squelettiques dans le myocarde infarci ?

Introduction

Au cours des dernières années, la greffe de myoblastes squelettiques (MS) est apparue comme une nouvelle option thérapeutique potentielle pour la réparation du myocarde après un infarctus. Plusieurs études expérimentales ont démontré que les MS peuvent se greffer sur les cicatrices constituées après un infarctus, pour se différencier en myotubes et améliorer la fonction cardiaque (Al Attar 2003). Toutefois, le faible taux de survie des cellules greffées représente une limitation majeure de cette intervention. Même si la mort et la prolifération cellulaires après injection de MS dans les tissus musculaires squelettiques sont des événements ayant fait l'objet d'études intensives (Beauchamp 1999, Guerette 1997, Skuk 2004), il n'existe que relativement peu de données concernant le myocarde infarci (Tambara 2003, Suzuki 2004). La présente étude est destinée à aborder cette question et à déterminer si l'application d'un stress thermique avant la greffe, par le chaud (heat shock : HS) ou le froid (cryo-congélation : Cryo) est susceptible d'améliorer la survie des myoblastes par l'intermédiaire d'une rétrorégulation positive des protéines de choc thermique (HSP, heat shock proteins), qui ont un rôle cytoprotecteur (Bouchentouf 2004, Mosser 2000, Buzzard 1998).

Pour suivre les MS après greffe, nous avons utilisé un système quantitatif de double marqueur, fondé sur la méthode de Partridge (Beauchamp 1997), qui consiste à greffer des MS de rats mâles nouveau-nés exprimant la β -Galactosidase (β -Gal) dans des cœurs de rats femelles. Lors de la mort cellulaire, il se produit rapidement une fuite de la β -Gal soluble

cytoplasmique, dont la quantification reflète la perte cellulaire précoce. En revanche, le chromosome Y, mesuré par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel du gène Y de la région déterminant le sexe (sry), est toujours transmis aux cellules filles et fournit une estimation quantitative du nombre total de cellules dérivées du donneur présentes dans le tissu. Le rapport entre les marqueurs de β -Gal et du gène Y constitue ainsi un indice de la prolifération cellulaire.

Matériel et méthodes

Les expériences menées ont respecté les *Principes relatifs aux soins des animaux de laboratoire* énoncés par la National Society for Medical Research et le *Guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire* préparé par l'Institute of Laboratory Animal Resources, la Commission on Life Science, le National Research Council, et publié par National Academy Press (texte révisé en 1996).

Production de myoblastes mâles exprimant la β -Galactosidase et traitements thermiques

Les cultures primaires de cellules musculaires ont été préparées à partir de rats mâles nouveau-nés Lewis (Janvier), comme décrit par ailleurs (Scorsin 2000, Pouzet 2000). Vingt-quatre heures après le début de la culture cellulaire, les cardiomyocytes ont été laissés sans traitement ou ont été soumis à un choc HS (incubateur à 42°C équilibré avec du CO₂ à 5% pendant 70 minutes), puis infectées avec l'adénovirus β -Gal (promoteur du cytomégalo virus [CMV], Genethon) avec un facteur 100 (30 min sans SFV). Vingt heures plus tard, des échantillons de 5 x 10⁶ cellules mâles fraîches ou soumises à un choc HS et exprimant la β -Gal ont été préparées. Le troisième groupe expérimental était constitué de MS mâles β -Gal qui ont été congelés conformément aux procédures standard dans un milieu MEM (Gibco/BRL) avec SFV à 20% et DMSO (Sigma) à 10%, jusqu'à la décongélation le jour de

la greffe. La proportion de MS a été estimée par immunomarquage par la desmine (clone D33, DAKO), méthode décrite par ailleurs (Scorsin 2000, Pouzet 2000), et atteignait en moyenne 36,4% [32,5–42%] au moment de la greffe. L'expression de β -Gal a été confirmée par un examen immunocytochimique après fixation dans du glutaraldéhyde à 0,25% et coloration par incubation d'une nuit dans du 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (1 g/l), ferricyanure de potassium (5 mmol/l), et MgCl₂ (2 mmol/l). L'expression d'HSP a été confirmée par analyse Western-blot (logiciel ImageQuant 5.2 d'analyse de densitométrie quantitative Western-blot, Molecular Dynamics) après incubation avec l'anticorps monoclonal anti-HSP70 (1 :500, Stressgene) révélé avec un deuxième anticorps conjugué à la peroxydase de raifort (1 :1000, Jackson Immunoresearch).

Les effets cellulaires protecteurs attendus induits par les modifications thermiques ont été évalués par l'estimation de la mort cellulaire *in vitro* (par apoptose/nécrose) après un stress oxydatif (H₂O₂ 100 μ mol/l, 20 minutes, 37°C) par marquage fluorescent à l'aide de colorants vitaux fluorescents (Molecular Probe) : le SYTO13, 0,6 μ mol/l (sonde permanente de marquage de l'ADN en vert) et l'iodure de propidium, 15 μ mol/l (sonde non permanente de marquage de l'ADN en orange). Cette évaluation a été effectuée 20 heures après le traitement HS ou la décongélation dans le groupe Cryo.

Modèle de lésions myocardiques

Soixante-quatre rates Lewis (Janvier) ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (Minerve) et un infarctus du myocarde a été généré par thoracotomie gauche, comme décrit par ailleurs (Scorsin 2000, Pouzet 2000). Huit jours après l'intervention, les animaux ont été randomisés pour recevoir, au niveau de l'infarctus et des zones péri-lésionnelles, des injections de milieu de culture seul (MEM avec ASB à 0,5%), ou 5 x 10⁶ cellules fraîches, HS ou Cryo dans un volume de 150 μ L. Les rats ont été sacrifiés 3 et 15 jours plus tard (n = 8 pour chaque groupe,

à chacun de ces deux moments). Malgré l'utilisation de souches syngéniques, un traitement par la ciclosporine (10 mg/kg/j, i.p., Novartis) a été instauré pendant toute la durée de l'étude, en raison de l'immunogénicité du transgène β -Gal, utilisé pour le suivi cellulaire.

Suivi des cellules greffées

Après sacrifice, les ventricules gauches, y compris le septum (n = 6 par groupe) ont été isolés et congelés dans de l'azote liquide, puis des homogénats ont été préparés. Des aliquotes ont été conservés pour le dosage de l'activité β -Gal et l'extraction de l'ADN.

Mesure de l'activité β -Gal

Après le dosage de la concentration en protéines des surnageants (trousse BCA, Pierce), l'activité β -Gal a été mesurée par une méthode luminométrique (β -Gal Reporter Gene Assay, Roche Diagnostics). Chaque réaction a été effectuée en triple exemplaire pour trois concentrations différentes. Les étalons internes ont été des échantillons de β -Gal à des concentrations connues. L'éventuelle corrélation avec le nombre de cellules a été établie au moyen de la valeur à 100% (c'est-à-dire le nombre de cellules présentes après injection de 5×10^6 cellules dans un ventricule gauche de rate immédiatement homogénéisé). Les résultats, exprimés en pourcentage de cellules survivantes, ont été normalisés par rapport aux concentrations en protéines et au nombre de cellules.

Mesure du chromosome Y

L'ADN a été extrait de l'ensemble des homogénats de ventricules gauches (Wizard Genomic DNA Purification kit ; Promega) puis a été analysé par PCR en temps réel à l'aide d'un appareil LightCycler (Roche Diagnostics) et du mélange réactif Fast Start DNA MasterPLUS SYBRGreen I (Roche Diagnostics). Chaque réaction a été effectuée en triple exemplaire dans

des conditions de réaction standard pour deux concentrations différentes. Le logiciel Primer Express a été utilisé pour produire les amorces directes SRYforward 5'-CAGACTCATCGAAGGG-3' et inverses SRYreverse 5'-CTGGTTCTTGGAGGACT-3' pour l'amplification de la région de 161 pb du gène *sry* (l'ADN généré a été évalué par séquençage). Le vecteur pGEM-T easy vector (Promega) contenant cette séquence de 161 pb a été utilisé comme témoin de rendement et de spécificité de l'amplification. Les résultats, exprimés en pourcentage de cellules survivantes, ont été normalisés par rapport à l'ensemble des homogénats de ventricules gauches et au nombre de cellules.

Immunohistofluorescence et hybridation fluorescente in situ (FISH)

Les cœurs (n = 2 par groupe) ont été congelés dans de l'OCT (Tissue-Tek). Les cryocoupes (7 µm) ont été fixées dans de l'acétone et préparées pour un examen par immunohistofluorescence destiné à détecter la formation de tissu musculaire squelettique après greffe. Après incubation avec un anticorps anti-chaîne lourde de la myosine rapide (FMyHC, 1 :300, Sigma), la détection a été effectuée à l'aide d'un deuxième anticorps conjugué à la cyanine 3 (1 :700, Fluorolink Cy3, Amersham). Ensuite, des lames ont été préparées pour l'examen FISH destiné à détecter les cellules mâles. Après fixation (PAF à 4%) et digestion (protéinase K 15 mg/l, Eurobio), les coupes ont été fixées dans du méthanol, puis dans une solution de Carnoy. La sonde Y 9.1ES8 dénaturée (Essers 1995), colorée à la fluorescéine par « déplacement de brèche » (« nick-translation ») a été hybridée aux tissus dénaturés (formamide à 70%), avec incubation pendant une nuit. Les lames ont été ensuite contre-colorées par DAPI (1 mg/l de milieu de montage VectaShiel, AbCys) puis examinées à la recherche de cellules à la fois FMyHC- (filtre de bande passante TRITC, Omega) et Y-positives (filtre de bande passante FITC, Omega) et de cellules uniquement Y-positives. Deux investigateurs indépendants ont déterminé le nombre de signaux FMyHC-positifs parmi les

200 noyaux Y-positifs (filtre de bande passante DAPI, Leica) sous microscopie à fluorescence (Leica).

Analyse des données

Les données ont été comparées par des tests non paramétriques de Kruskal et Wallis, suivis d'une correction de Holm pour comparaisons multiples. Les résultats sont exprimés sous forme de valeurs médianes (minimum-maximum). Le seuil de signification statistique a été fixé à $P < 0,05$.

Résultats

Effets cytoprotecteurs *in vitro* des traitements thermiques par induction de l'expression des protéines de choc thermique (HSP)

Nous avons d'abord essayé différentes associations de températures (42°C et 43°C) et de durée (30 et 60 minutes) pour induire l'expression des HSP et avons trouvé que les meilleures conditions étaient une température de 42°C pendant 70 minutes, 24 heures après le début de la culture de cellules primaires et 20 heures avant la récolte des cellules pour la greffe. L'analyse de densitométrie quantitative Western-blot a montré que, comparativement au groupe de cellules fraîches, l'expression des HSP70 a été respectivement six et sept fois supérieure dans les groupe Cryo et HS (Fig. 1A).

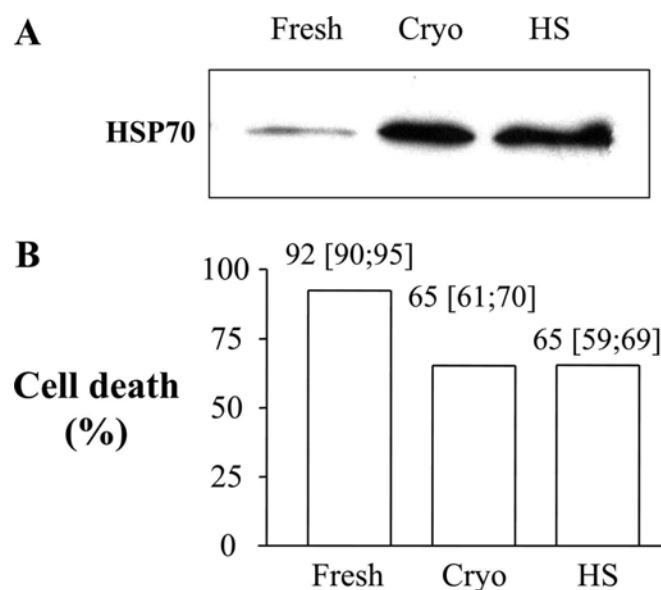


FIGURE 1. Corrélation entre la surexpression de HSP70 et la survie cellulaire. (A) Analyse Western-blot confirmant un niveau plus élevé d'expression de HSP70 (immunobuvardage de HSP70 représentatif) 20 heures après décongélation ou traitement, comparativement aux cellules fraîches témoin. La surexpression a été déterminée comparativement à la coloration au rouge Ponceau (données non présentées). (B) Évaluation de la cytoprotection conférée par les deux traitements thermiques par rapport à un stress oxydatif (H_2O_2 100 μ mol/l pendant 20 minutes). Les pourcentages de cellules morphologiquement mortes (cellules fraîches, Cryo et HS) après incubation avec de l' H_2O_2 ont été déterminés grâce au double marquage par sonde SYTO13 et iodure de propidium. Les données résultent de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triple (300 cellules par boîte).

Une estimation de la mort cellulaire *in vitro* a ensuite été effectuée pour confirmer les effets protecteurs des HSP contre les lésions cellulaires induites par le peroxyde d'hydrogène. La Figure 1B montre que les deux traitements thermiques ont considérablement diminué la mortalité cellulaire liée à l'apoptose/la nécrose, le taux de mort cellulaire diminuant de 92% [90–95%] dans le groupe de cellules fraîches à respectivement 65% [61–70%] et 65% [59–69%] dans les groupes Cryo et HS.

Expression de la β -Galactosidase portée par un vecteur adénoviral et utilisée comme marqueur semi-conservateur : stabilité et absence d'effet du stress et de la différenciation

Vingt-quatre heures après l'infection adénovirale, les cultures primaires de MS de rats nouveau-nés ont été colorées pour marquer l'expression de la β -Gal. Sur plus de 3 000 cellules comptées, 93,7% [90,8–96,7%] étaient β -Gal-positives (Fig. 2A). Dans les cultures

cellulaires, l'expression des protéines a été stable pendant environ 3 semaines (données non présentées), ce qui a validé l'utilisation de la β -Gal comme marqueur semi-conservateur pour le suivi cellulaire *in situ* pendant la durée de notre protocole. En outre, ni l'infection virale ni l'expression des protéines β -Gal n'ont interféré sur le potentiel de différenciation myogène, comme l'a montré la formation de petits myotubes et la coloration concomitante de FMyHC et β -Gal dans les structures cellulaires aux sites d'injection 3 et 15 jours après la greffe (données non présentées).

Il existe peu de données concernant l'influence de la différenciation ou du traitement HS sur l'expression de la β -Gal par les cellules après transduction. Par conséquent, nous avons évalué l'activité β -Gal dans un ventricule gauche de femelle après injection de 5×10^6 cellules fraîches, Cryo ou HS et homogénéisation immédiate (temps 0) (Fig. 2B). Cette activité a été comparée à celle observée après 3 et 15 jours de culture cellulaire. Dans chacun des groupes, il n'y a pas eu de modification d'activité β -Gal entre le temps 0 (cellules fraîches, 2,5 [2,2–2,7] ; Cryo, 3,0 [2,3–3,1] ; HS, 3,1 [2,7–3,3] unités arbitraires [u.a.]/mg de protéines) et celle observée à 3 jours (cellules fraîches, 2,7 [2,2–2,8] ; Cryo, 2,9 [2,2–3,3] ; HS, 3,3 [2,9–3,5] u.a./mg de protéines) ou 15 jours (cellules fraîches, 2,4 [2,1–2,7] ; Cryo, 2,9 [2,7–3,2] ; HS, 3,0 [2,8–3,3] u.a./mg de protéines). Ces résultats montrent que l'expression de la β -Gal n'a pas été affectée par la différenciation myogène *in vitro* ou les traitements thermiques. Le pourcentage de cellules β -Gal-positives a ensuite été exprimé par rapport au nombre de cellules présentes dans le tissu cible au temps 0, pour éviter une surestimation artéfactuelle susceptible de se produire lorsque les valeurs basales à 100% font uniquement référence au culot cellulaire (Skuk 2003).

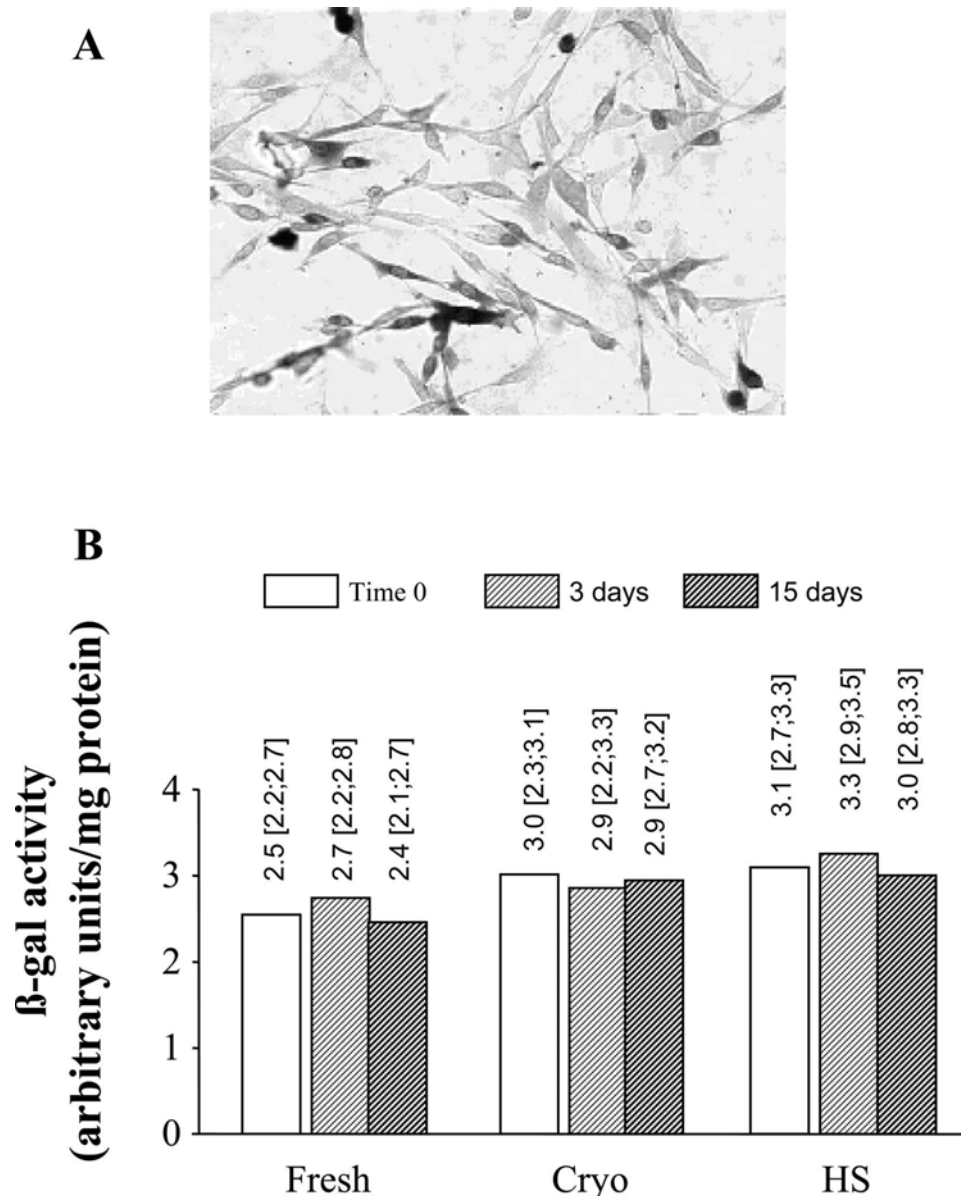


FIGURE 2. La β -Galactosidase en tant que marqueur semi-conservé. (A) Culture primaire de MS de nouveau-nés mâles exprimant la β -Gal. Vingt heures après l'infection, la coloration de la β -Gal a montré que presque toutes les cellules expriment une β -Gal cytoplasmique (amplification 40x). (B) Mesure de l'activité de la β -Gal par méthode de chimioluminescence dans les cellules fraîches, Cryo et HS immédiatement après leur injection dans le tissu cardiaque et dans les cultures cellulaires à 3 et 15 jours. Les données résultent de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triple pour trois concentrations différentes.

Dans le cœur de l'hôte, perte rapide de la majorité des MS après greffe intramyocardique et prolifération des MS survivants

Comme attendu, la majorité des MS frais greffés a rapidement disparu, ce qui a été mis en évidence par une diminution considérable de l'activité β -Gal au cours des 3 jours suivant la greffe, résultant en un taux de survie de 4,1% ([0,3–7,1%] Fig. 3A). La perte du marqueur du

chromosome Y a été concomitante (activité résiduelle de 3,8% [0,2–10%] ; Fig. 3A). Par conséquent, le rapport β -Gal /ADN mâle 3 jours après la greffe a été de 0,9 [0,1–3,7] u.a. (Fig. 4), ce qui indique l'absence de prolifération à ce moment précoce. La disparition des MS du donneur après greffe a été encore plus importante par la suite puisque 15 jours après la greffe on ne détectait que 1,2% [0,4–1,9%] de l'activité β -Gal (Fig. 3B). En revanche, à ce moment-là, les cellules mâles Y-positives représentaient 25,1% [21,5–36,7%] de la population initiale (Fig. 3B), ce qui démontre un taux de prolifération active des cellules survivantes (29,4 [12,4–57], Fig. 4).

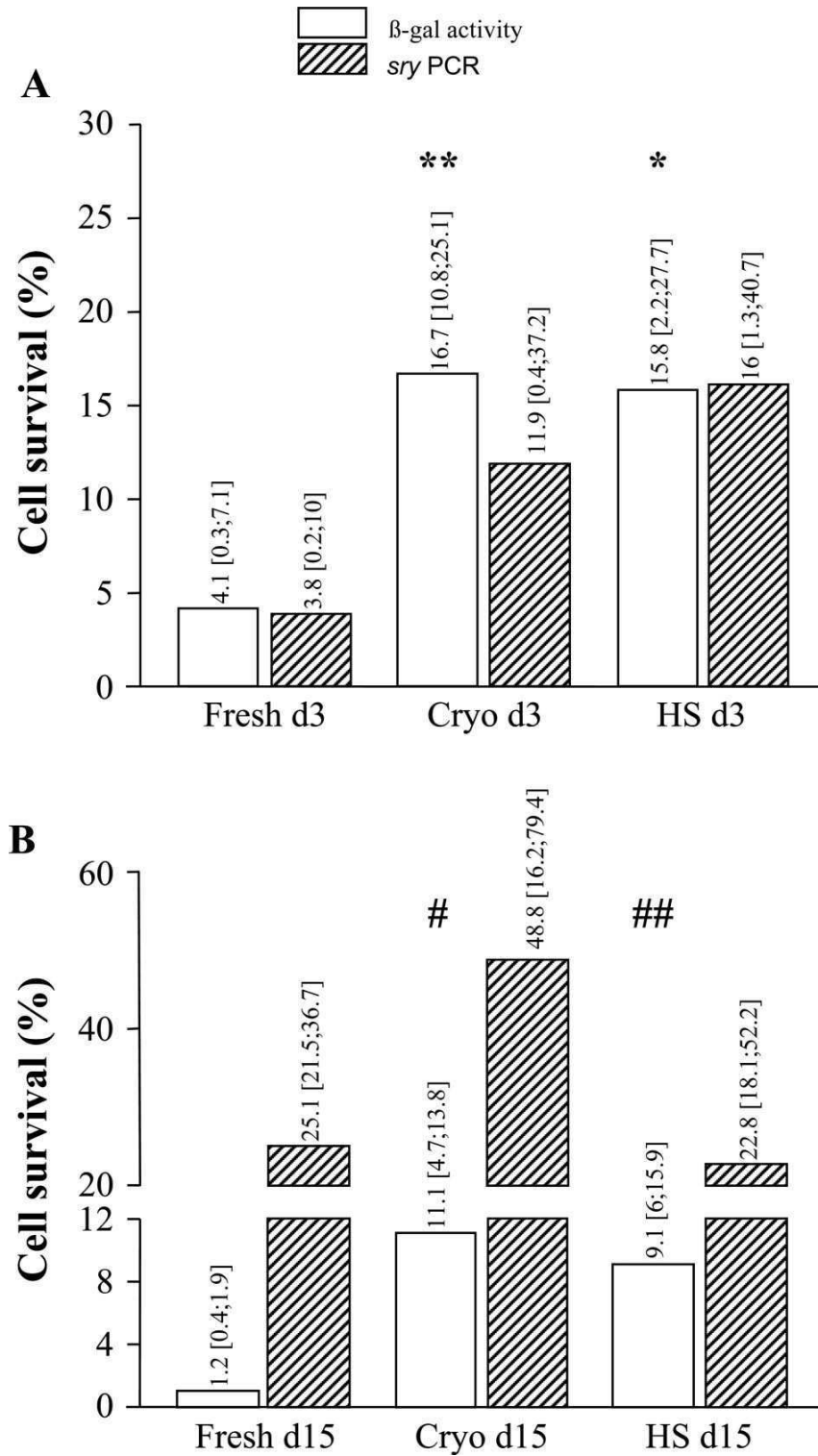


FIGURE 3. Survie précoce (A) et tardive (B) des MS mâles exprimant la β -Gal, après greffe dans des cœurs hôtes femelles post-infarctus. L'activité β -Gal (histogrammes vides), mesurée par méthode de chimioluminescence, et la quantité de chromosome Y (histogrammes hachurés), mesurée par PCR quantitative en temps réel, sont présentées sous forme de pourcentages de cellules par rapport à la valeur à 100% (n = 6 dans chaque groupe). * P = 0,016 cellules fraîches vs. HS ; ** P = 0,004 cellules fraîches vs. Cryo ; # P = 0,014 cellules fraîches vs. Cryo ; ## P = 0,006 cellules fraîches vs. HS.

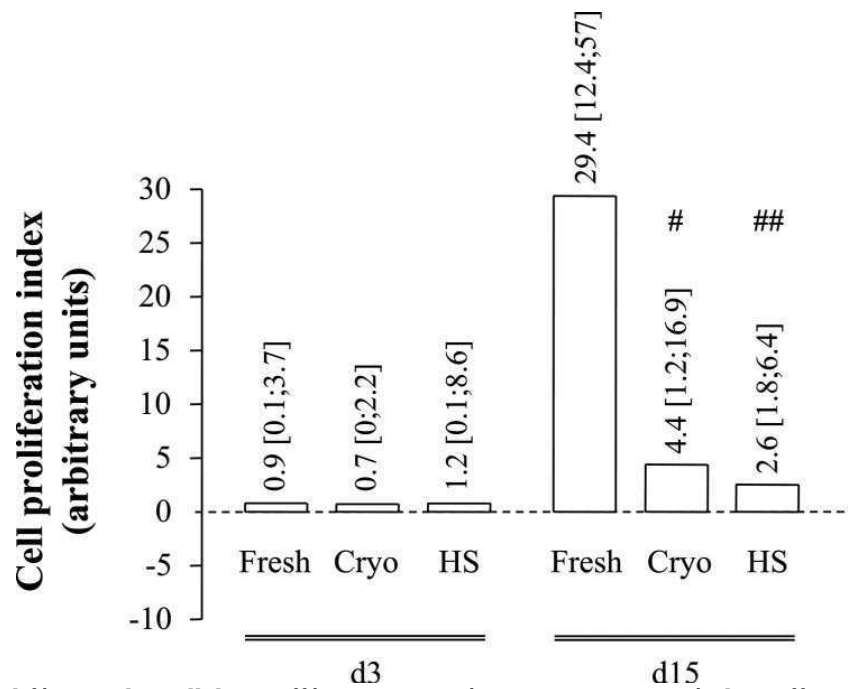


FIGURE 4. Prolifération des cellules greffées ayant survécu 3 et 15 jours après la greffe. # $P = 0,027$ cellules fraîches vs. Cryo ; ## $P = 0,006$ cellules fraîches vs. HS.

Dans le cœur de l'hôte, le choc thermique améliore la survie précoce et retardée, mais provoque une diminution de la prolifération cellulaire

Trois jours après la greffe, le nombre de cellules survivantes β -Gal-positives a été significativement plus élevé dans les deux groupes soumis à un traitement thermique par rapport au groupe des cellules fraîches, se traduisant par des taux de survie de respectivement 16,7% (10,8–25,1%) et 15,8% [2,2–27,7%] dans les groupes Cryo et HS ($P = 0,004$ cellules fraîches vs. Cryo ; $P = 0,016$ cellules fraîches vs. HS ; Fig. 3A). Deux semaines après la greffe, le taux global de survie était un peu plus faible mais les effets protecteurs des deux traitements thermiques étaient encore apparents, avec des taux de survie moyens respectifs de 11,1% [4,7–13,8%] et 9,1% [6–15,9%] dans les groupes Cryo et HS ($P = 0,014$ cellules fraîches vs. Cryo ; $P = 0,006$ cellules fraîches vs. HS ; Fig. 3B).

La perte du chromosome Y a été concomitante à celle des valeurs de β -Gal 3 jours après la greffe (Cryo : 11,9% [0,4–37,2%] ; HS : 16% [1,3–40,7%], Fig. 3A), reflétant ainsi une absence de prolifération (Cryo : 0,7 [0–2,2] ; HS : 1,2 [0,1–8,6] u.a. ; Fig. 4). En revanche,

15 jours après la greffe, une augmentation significative des cellules mâles a été observée (Cryo : 48,8% [16,2–79,4%] ; HS : 22,8% [18,1–52,2%] ; Fig. 3B) mais cette prolifération (Cryo : 4,4 [1,2–16,9] ; HS : 2,6 [1,8–6,4] u.a, Fig. 4) était encore significativement plus faible dans le groupe des cellules fraîches (cellules fraîches vs. Cryo : $P = 0,027$; cellules fraîches vs. HS : $P = 0,006$; Fig. 4). En raison d'un schéma inversement proportionnel dans le temps entre les faibles taux de survie et les taux élevés de prolifération du groupe des cellules fraîches et les taux de survie élevés et de prolifération réduits dans les groupes HS et Cryo, le nombre total de cellules du donneur finalement identifiées 15 jours après la greffe n'était pas significativement différent dans les trois groupes.

Expression d'un phénotype musculaire squelettique dans la majorité des cellules greffées survivantes

Après colorations séquentielles des coupes cardiaques pour détection de FMyHC et chromosome Y par respectivement immunohistochimie et FISH, les cellules myogènes représentaient 79,3% [66,8–91,8%] des cellules greffées des donneurs mâles, sans différences entre les groupes 3 ou 15 jours après la greffe (Fig. 5A et B). Aucun signe de fusion entre les MS greffés et les cardiomyocytes hôtes n'a été observée (absence de polyploïdie) dans les coupes examinées.

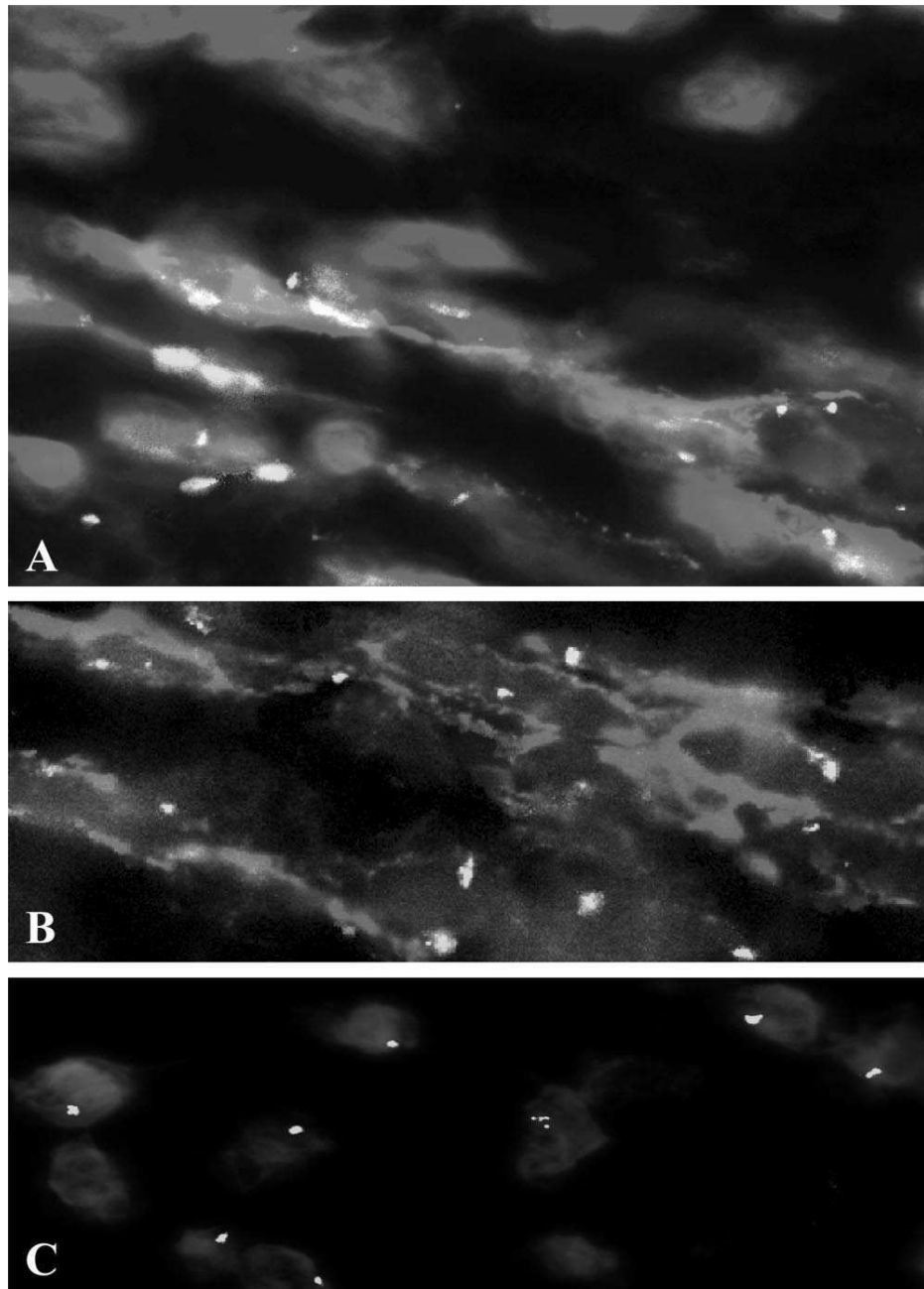


FIGURE 5. Coloration séquentielle par fluorescence/FISH pour la détection du FMyHC (rouge) et du chromosome Y (sonde 9.1ES8, vert) pour déterminer le pourcentage de cellules dérivées du muscle squelettique dans la population de cellules mâles greffées, sur les coupes de cryostat. Limites (A) et centre (B) des zones greffées (n = 12). (C) Témoin positif pour la sonde 9.1ES8 (amplification 100 X)

Discussion

La mort cellulaire constitue une limitation bien reconnue de la greffe de MS, qui peut sérieusement compromettre les bénéfices des transplantations de cellules, puisque le résultat fonctionnel des cœurs ayant bénéficié d'une greffe de myoblastes après un infarctus semble étroitement corrélé au nombre de cellules injectées (Tambara 2003). Cependant, les tentatives pour surmonter ce problème en augmentant sensiblement le nombre de cellules injectées sont limitées par des aspects significatifs sur le plan clinique (durée des cultures, volume pouvant être injecté en toute sécurité et coût). Il est donc probable qu'une approche plus intéressante consiste à mettre au point des stratégies d'optimisation de la survie cellulaire post-greffe. Cela nécessite de disposer d'études fournissant des données quantitatives sur la fraction de survie des myoblastes injectés et la capacité de prolifération des cellules survivantes. La présente étude avait donc pour objectif principal de suivre l'évolution des MS injectés dans le myocarde infarci en utilisant le système initialement décrit par Partridge (Beauchamp 1997), qui repose sur les modes héréditaires distincts de deux marqueurs après division cellulaire. Le premier marqueur était un transgène de β -Gal porté par un adénovirus, maintenu en position épisomique non intégrative dans le noyau et transmis d'une manière semi-conservative, aboutissant à un nombre de copies stable indépendamment du nombre de cellules. Le deuxième marqueur était le chromosome Y, naturellement transmis de manière conservative, aboutissant à une augmentation du nombre de copies en fonction du nombre de cellules. Même si on peut rétorquer que la captation des débris cellulaires par les macrophages et l'internalisation ultérieure de l'ADN résultant est susceptible de conduire à une surestimation du nombre de copies de cellules Y, nos résultats ne corroborent pas cette réserve, puisqu'ils montrent que la majorité des cellules Y-positives ont également un phénotype spécifique au muscle squelettique.

Avec ces systèmes d'analyse, nos résultats montrent que la plupart des MS frais issus des cultures primaires meurent peu après la greffe au niveau de la cicatrice d'infarctus. Cependant, les cellules restantes gardent leur capacité à se diviser à un taux qui ne rattrape pas la perte initiale avant la différenciation en structures musculaires squelettiques. Ces résultats sont proches de ceux précédemment décrits dans le muscle squelettique par Beauchamp (Beauchamp 1999) sauf que dans leurs expériences, les deux courbes de survie et de prolifération ont commencé à diverger plus tôt que dans notre étude ; cette différence s'explique peut-être par le fait que le protocole de Beauchamp comportait une greffe de cellules dans des muscles pré-irradiés de souris dystrophiques, qui constituent un environnement hôte optimisé pour la prolifération des MS (Beauchamp 1999). Nous avons également observé une mortalité cellulaire initiale plus importante que celle décrite dans les cœurs de rats normaux ayant reçu des injections de myoblastes immortalisés (Suzuki 2004). Une explication plausible de cette différence est notre utilisation de cellules issues de cultures primaires et injectées dans un tissu infarci, associé à une inflammation locale, une fibrose et un remodelage, qui ont pu contribuer à augmenter la mort cellulaire précoce. L'analyse détaillée des raisons du faible taux de greffon cellulaire fonctionnel dépasse le champ de la présente étude. Les données de la littérature suggèrent toutefois qu'à part la fuite physique des cellules injectées dans la circulation systémique, plusieurs facteurs contribuent à la perte des cellules restées dans le myocarde, notamment l'hypoxie cellulaire liée à la faible vascularisation des tissus cicatriciels ciblés et le profil inadéquat des cellules greffées par rapport à la matrice extracellulaire. Ces mécanismes sont mis en évidence dans les études montrant qu'il est possible d'améliorer la greffe cellulaire de façon importante en augmentant l'angiogénèse dans la zone greffée (Azarnoush 2005) et en incluant les cellules dans une matrice tridimensionnelle bio-résorbable (Christman 2004). Avec ce raisonnement à l'esprit, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la production des HSP

déclenchée par un stress thermique avant greffe (facile à mettre en œuvre cliniquement HS ou Cryo), pouvait également contribuer à augmenter la survie cellulaire en agissant sur d'autres composants de la mort cellulaire comme l'apoptose et les lésions oxydatives.

L'exposition des myoblastes à une température de 42°C pendant 70 minutes a été à l'origine, comme attendu, d'une augmentation de plusieurs protéines HSP, y compris HSP70. Ceci a été associé à une augmentation de la survie cellulaire précoce, ce qui corrobore une publication antérieure (Suzuki 2000) démontrant que l'application d'un choc thermique sur une lignée cellulaire de myoblastes (42°C, 60 min) provoque une augmentation de l'expression de HSP72 et entraîne un quasi-doublage de la survie de la greffe. Fait intéressant, le traitement Cryo a également induit une surexpression de HSP70 semblable à celle obtenue avec une procédure de chauffage classique, ce qui concorde avec les études de micropuces à ADN montrant que les gènes de secours cellulaire, y compris ceux codant pour les HSP, font partie de ceux principalement surexprimés par le traitement Cryo (Odani 2003). Même si la présente étude n'est pas destinée à explorer les aspects mécanistiques, on peut supposer que l'amélioration des taux de survie des myoblastes observés dans les cœurs ayant reçu des cellules HS et Cryo, par rapport à ceux ayant reçu des cellules fraîches, est au moins partiellement due aux multiples effets cyto-protecteurs des HSP. Ces effets font intervenir une augmentation des défenses anti-oxydatives (Suzuki 2004, Yamashita 1997), une diminution de p53 (Chen 1999), une induction de Bcl2 (Wang 1999), une inhibition de l'activation de la protéase caspase 3 liée au CED-3 et de la kinase N terminale c-Jun/protéine kinase activée par le stress (Guerette 1997, Buzzard 1998).

Limites

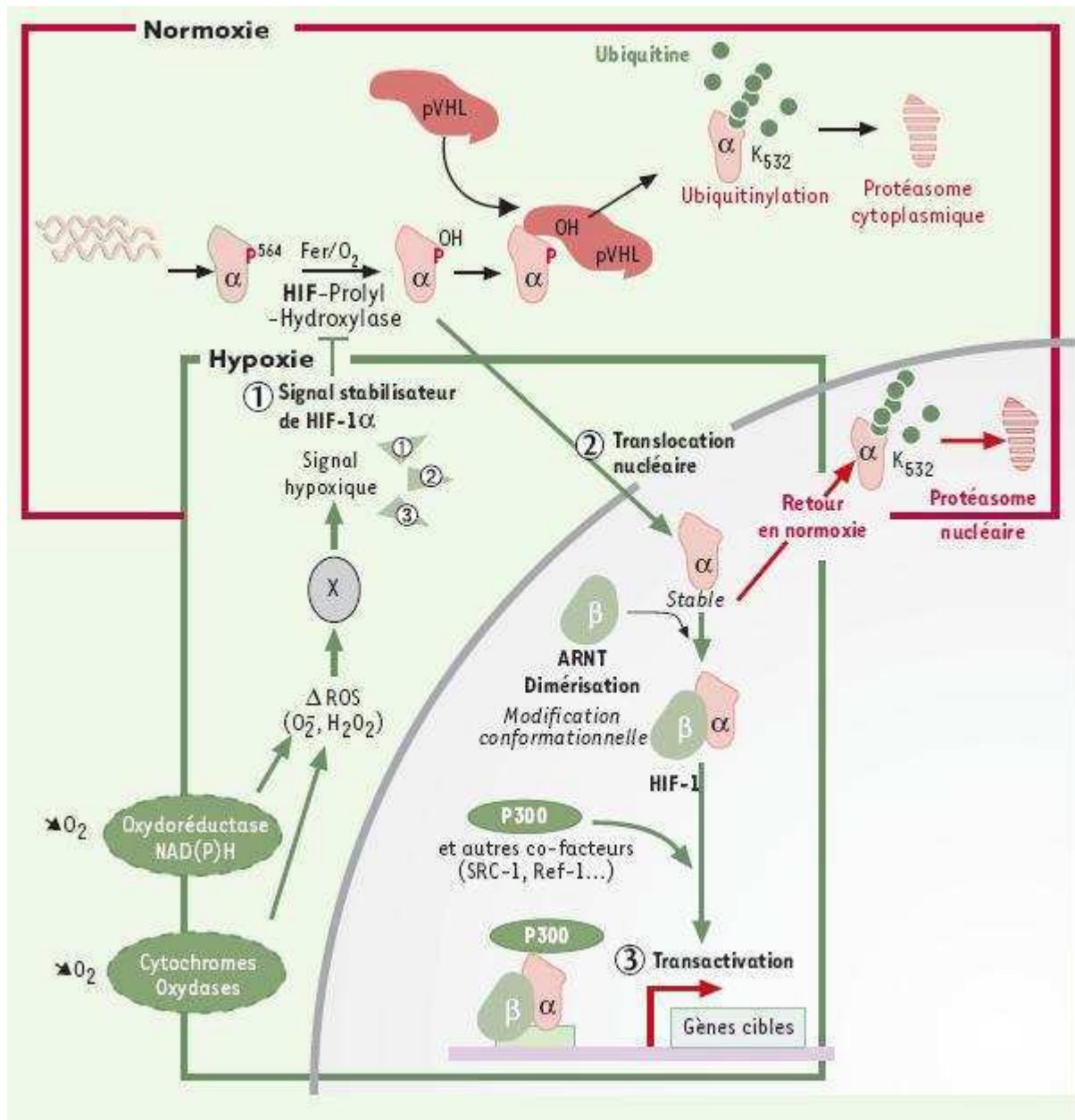
Toutefois, les bénéfices de cette augmentation de survie précoce ont été affectés par la diminution du taux de prolifération ultérieure dont les raisons ne sont pas encore expliquées. Il est improbable qu'il s'agisse d'un effet indésirable de la ciclosporine puisque ce médicament a été administré à la même dose dans le groupe ayant reçu une injection de myoblastes frais. En revanche, comme la chaleur modifie la stabilité de la chromatine (Roti Roti 1992, Honda 2001), on peut supposer que le choc thermique désactive les gènes régulant la division cellulaire et stimule plutôt les voies de différenciation. Sinon, il est possible qu'en raison de l'abondance initiale des cellules HS ou Cryo dans le tissu greffé, on atteigne plus rapidement le seuil de densité au delà duquel les contraintes spatiales, inhérentes aux limites relativement inextensibles du micro-compartiment fibrotique dans lequel elles sont greffées, les conduisent vers la différenciation. À la fin de la période d'observation, le nombre total de cellules dérivées du donneur n'était pas différent entre les groupes ; or, dans les deux groupes soumis aux traitements thermiques avant greffe, le taux de survie à 15 jours après la greffe n'était pas supérieur à 15%, ce qui suggère indirectement que l'apoptose, normalement diminuée par une sur-expression des HSP, ne joue qu'un rôle relativement minime dans la perte des cellules greffées, comparativement aux autres facteurs mentionnés. Un résultat plus encourageant a été que nos données d'examen d'immunohistochimie et FISH ont montré une survie/prolifération plutôt sélective des composants myogènes de l'injecta initial (qui ne contenait que 36,4% de cellules desmine-positives), ce qui corrobore l'existence d'une relative résistance des MS aux environnements inhospitaliers comme les cicatrices post-infarctus.

Conclusion

La présente étude permet de quantifier davantage les profils de mort cellulaire et de prolifération des MS greffés dans un myocarde après un infarctus. Nous avons pu établir un banc d'essai pour tester les stratégies d'augmentation de la survie cellulaire et les résultats obtenus suggèrent un intérêt limité des traitements thermiques HS pour l'amélioration de la greffe cellulaire, ainsi que l'absence d'effets délétères du traitement Cryo. Ce dernier résultat est particulièrement important sur le plan clinique puisque les contraintes logistiques inhérentes au transport sur de longues distances pourraient bénéficier des techniques de cryoconservation cellulaire.

2- Amélioration des bénéfices fonctionnels de la greffe de myoblastes squelettiques par l'administration associée au Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF 1 α)

Un deuxième travail était mené, en même temps, partant de l'hypothèse de départ sur la mortalité cellulaire du greffon. L'amélioration des conditions locales d'ischémie par l'association de la thérapie cellulaire à la thérapie génique était l'axe choisi. Les travaux sur le vascular endothelial growth factor (VEGF) étaient nombreux (Hedman 2003), sans résultat extraordinaire. Hypoxia Inducible Factor (HIF) est découvert par Semenza (Semenza 1991). HIF-1 est un hétérodimère obligatoire qui comprend un composant alpha de 826 acides aminés. Sur le plan du génome, on le retrouve constituée de 15 exons, sur le chromosome 14 (14q21-q24). En condition hypoxique, le HIF 1 α n'est plus hydroxylé par le HIF-prolyl-hydroxylase et s'associe avec la sous unité β pour activer environ 20% de l'ADN nucléaire de la cellule pour la mise en route des éléments de survie.



Audrey Bergeron (24 novembre 2007)

Apport personnel pour ce travail, publié : *J Thorac Cardiovasc Surg. 2005 Jul;130(1):173-9.*

(cf chapitre IX) :

- chirurgie et anesthésie de tous les animaux opérés
- injections quotidiennes de ciclosporine et soins courants sur toute la durée du protocole
- préparation et culture cellulaire
- préparation des échantillons après sacrifice des animaux
- collecte des données
- participation à l'analyse des données, rédaction finale de l'article

Collaborations et aides pour l'élaboration du projet :

- Agnès Maurel et Claire Carrion : collaboration active pour toutes les manipulations en laboratoire et expertise en culture de cellules, PCR, Western blot...
- Alain Hagège et Laurent Sabbah : cardiologues référents de l'étude pour les échocardiographies
- Alvine Bissery : analyse statistique
- Julia Pouly : aide au comptage de l'angiogenèse
- Patrick Bruneval, Chantal Mandet : préparation des lames et analyse histologique
- Professeur Philippe Menasché : directeur du travail et véritable référent, du début jusqu'à la finition complète. Aide et soutien intellectuel, financier, logistique, psychologique et rédactionnel.

« Amélioration des bénéfices fonctionnels de la greffe de myoblastes squelettiques par l'administration associée au Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF 1 α) »

Introduction

Au cours des dernières années, la greffe cellulaire est apparue comme une nouvelle option thérapeutique potentielle chez les insuffisants cardiaques (Menasché 2004). Cette approche s'appuie sur un nombre important d'études expérimentales qui ont montré que l'implantation de différents types de cellules dans le tissu cicatriciel pouvait régénérer les régions concernées grâce à des modifications favorables dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Fujii 2003), la contribution directe à l'activité contractile (Rubart 2003) ou le recrutement selon un mode paracrine d'un groupe résidant de cellules souches cardiaques (Beltrami 2003, Oh 2003) : principalement les myoblastes squelettiques (Scorsin 2000, Pouzet 2001, Murry 1996) (Taylor 1998), les cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (Shake 2002) et les cellules souches embryonnaires (Min 2002). Ces données ont ouvert la voie à des essais cliniques précoces s'appuyant sur des techniques chirurgicales (Menasche 2003) ou de cathétérisme (Smits 2003) dont les résultats fonctionnels, bien qu'encourageants, nécessitent d'être validés ultérieurement par des essais randomisés, certains étant déjà en cours.

Cependant, l'un des principaux facteurs limitant de la technique est le taux massif de mort cellulaire survenant rapidement après les injections (Zhang 2001), en grande partie en raison de la nature ischémique de l'environnement dans lequel sont implantées les cellules. Cette hypothèse a donc conduit au concept selon lequel, corrélativement, la survie cellulaire et l'amélioration fonctionnelle qui est supposée en découler pourraient s'accroître par une amélioration de la perfusion vasculaire de la zone greffée. La présente étude a donc été

conçue pour tester cette hypothèse en évaluant, dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat, les effets de l'association d'une greffe de myoblastes squelettiques et du facteur de transcription induit par l'hypoxie 1α (HIF- 1α), qui est un gène de survie régulant l'expression de plusieurs gènes codant pour des facteurs de croissance angiogéniques (Semenza 1991, Semenza 2002).

Méthodes

Les expérimentations ont été conformes aux « Principles of Laboratory Animal Care » (Principes relatifs aux soins des animaux de laboratoire) formulés par la National Society for Medical Research et au « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » (Guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire) préparé par l'Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council et publié par National Academy Press, révisé en 1996.

Cultures cellulaires

Les cultures de cellules musculaires primaires ont été préparées à partir de rats mâles nouveau-nés Wistar (Charles Rivers, L'Arbresle, France) en utilisant un protocole préalablement établi. Le jour de la greffe, les cellules ont été décongelées et lavées 3 fois dans du milieu d'Eagle modifié additionné de 0,5 % d'albumine sérique bovine (fraction V; Sigma, St Louis, Mo, USA). Des échantillons de 5×10^6 cellules ont été préparés et conservés à température ambiante jusqu'à la greffe. La viabilité et le pourcentage des myoblastes squelettiques ont été respectivement évalués par exclusion au bleu de trypan et immunomarquage de la desmine.

HIF-1 α

L'hybride HIF-1 α /VP-16 a été construit par isolement du gène HIF-1 α au niveau de l'acide aminé 390 et jonction au domaine transactivateur du virus herpes simplex VP-16. L'expression génique est régulée par le gène promoteur du cytomégalo virus. L'efficacité de cette construction HIF-1 α /VP-16 a été montrée in vitro et dans des expérimentations animales (Vincent 2000, Shyu 2002). Dans la présente étude, la construction a été insérée dans le génome d'un vecteur adénoviral 2 (Genzyme BioSurgery, Cambridge, Mass., USA), comme décrit précédemment (Vincent 2002, Jiang C. 2002). Le vecteur vide a été construit de façon similaire à Ad2/HIF-1 α /VP16, excepté qu'il était dépourvu de transgène ; en conséquence, il a été montré qu'il induisait uniquement une légère réponse inflammatoire transitoire qui ne génère pas d'effets angiogéniques notables.

Modèle d'infarctus du myocarde

Des rates Wistar (Charles Rivers) ont été anesthésiées par isoflurane (1 %-3 %) sous un flux constant d'oxygène (1 à 2 l/min.) et ventilées par sonde endotrachéale. Un infarctus du myocarde a alors été provoqué par ligature de l'artère inter ventriculaire antérieure à l'aide d'un fil serti : 6-0 polypropylène (Ethicon Inc, Somerville, NJ, USA), via une thoracotomie latérale gauche.

Protocole expérimental

Huit jours après la création de l'infarctus, le thorax a été réouvert par sternotomie médiane. Simultanément, les cellules ont été décongelées et préparées. Les rates ont ensuite été affectées de manière aléatoire en 5 groupes, traités par des injections intra myocardiques de milieu de culture seul (animaux témoins, n = 11), de myoblastes squelettiques seuls (5×10^6 , n = 13), de HIF-1 α encodé par adénovirus seul ($1,0 \times 10^{10}$ ufp /ml, n = 7) ou de myoblastes squelettiques (5×10^6) associés soit à un vecteur vide du HIF-1 α (n = 3) soit au HIF-1 α actif

($1,0 \times 10^{10}$ ufp /ml, $n = 13$) après mélange des deux solutions dans la même seringue. Un sixième groupe ($n = 9$) a subi une approche par étapes, par laquelle le HIF-1 α ($1,0 \times 10^{10}$ ufp /ml) était injecté au moment de l'infarctus, tandis que les myoblastes squelettiques (5×10^6) étaient administrés de la manière classique huit jours plus tard.

Toutes les injections étaient sous un volume de 150 μ l, administré dans quatre ou cinq sites du centre et sur les bords de la zone d'infarctus à l'aide d'une aiguille de 29 gauge.

Une immunodépression par ciclosporine (DCI : ciclosporine, 10 mg/kg, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France) était instituée au moment de l'infarctus du myocarde et poursuivie ensuite jusqu'à la fin de l'étude.

Critères de jugement

Fonction ventriculaire gauche. La fonction ventriculaire gauche (VG) a été évaluée au moyen d'une échocardiographie bidimensionnelle peu de temps avant les injections (c'est-à-dire six et huit jours après l'infarctus) et au bout d'un mois, conformément au protocole préalablement décrit (Scorsin 2000). Après tracé des contours endocardiques à l'aide d'une technique de pointe, les longueurs et les surfaces maximales du VG selon l'axe longitudinal ont été mesurées sur un mode dynamique sur un cycle cardiaque à la fin de la diastole (au moment où la dimension apparente de la cavité est maximale) et à la fin de la systole (au moment du déplacement antérieur maximal de la paroi postérieure). Ces données ont ensuite été utilisées pour calculer le volume télédiastolique du VG (VTDVG), le volume télésystolique du VG (VTSVG) et la fraction d'éjection (FE ; $FE (\%) = 100 \times (VTDVG - VTSVG) / VTDVG$) à l'aide de la méthode « surface-longueur » monoplan $V = 8A^2/3\pi L$. Toutes les mesures ont été effectuées par un observateur expérimenté unique qui ne connaissait pas les groupes de traitement. La valeur retenue a été la moyenne des mesures sur trois à cinq cycles cardiaques consécutifs.

Prise de la greffe cellulaire et angiogenèse. Après la dernière évaluation échocardiographique, les animaux ont été sacrifiés. L'objectif principal de cette étude étant d'évaluer si la protection supplémentaire que devait assurer le HIF-1 α était liée à une augmentation de l'angiogenèse, seuls les cœurs ayant reçu des injections de myoblastes seuls ou associés au HIF-1 α ont été utilisés dans cette partie du protocole. Les cœurs de ces deux groupes ont été prélevés et séparés en deux en sectionnant suivant l'axe court la portion médiane de la région infarctée. Des études histologiques et immunohistochimiques ont été menées sur les deux blocs de chaque cœur à partir de coupes au cryostat de 5 μ m d'épaisseur fixées dans l'acétone pendant 10 minutes. Pour l'évaluation histologique (c'est-à-dire étendue de la zone cicatricielle et prise de la greffe de myoblastes), les coupes ont été colorées au bleu de toluidine. Pour l'immunohistochimie, une technique classique en trois étapes utilisant les phosphatases alcalines (marquage rouge) et/ou la peroxydase (marquage marron) a été utilisée pour détecter les cellules myogéniques squelettiques (marquage rouge) à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne lourde isoforme de la myosine rapide du muscle squelettique (clone My32, Sigma) ou les cellules endothéliales de rats (marquage marron) à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre les cellules endothéliales de rat (RECA; Serotec, Oxford, Royaume-Uni) ou les deux en pratiquant un examen immunohistochimique associé sur la même coupe tissulaire.

Chez chaque rat, la coupe cardiaque comportant la meilleure prise de greffe de myocytes squelettiques a été sélectionnée pour quantifier l'angiogenèse. À cette fin, le nombre de coupes capillaires marquées au RECA a été compté dans une moyenne de 10 champs microscopiques sélectionnés au hasard, à l'aide d'un microscope classique équipé d'un oculaire quadrillé à grossissement x 10 ; le résultat est exprimé en nombre par unité de

champs ($625 \mu\text{m}^2$). Le pourcentage de prise de greffe a été calculé par le ratio de la zone positive à la myosine sur la zone infarctée, mesuré par planimétrie numérique.

Survie cellulaire. Dans un sous-groupe d'animaux impliquant la greffe de myoblastes mâles chez des receveurs femelles, les ventricules gauches extraits à la fin de l'étude ont été congelés ultra rapidement dans de l'azote liquide et stockés à -80°C . Le tissu musculaire a été décongelé sur glace, broyé et lysé pour obtenir une solution homogène dans un tampon de lyse (Roche, Bâle, Suisse) à 4°C pendant une nuit. L'ADN a ensuite été isolé sur l'ensemble des homogénats à l'aide de la trousse de purification de l'ADN Wizard (Promega, Charbonnières, France) et dissous dans un tampon Tris-HCl (5 mmol/l , pH 8,5).

Afin de déterminer la quantité de cellules mâles, nous avons utilisé SYBERGreen (Applied Biosystems, Foster City, Califn, USA), un test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) quantitatif, en temps réel, à base de colorant chimique présentant une affinité pour l'ADN double brin. Une séquence spécifique du chromosome Y du rat dans le gène sry (sex-determining region y) a été utilisée pour déterminer les quantités relatives de cellules mâles après la greffe. Les amorces utilisées, 5'-CAGACTCATCGAAGGG-3' (sens) et 5'-AGTCCTCCAAGAACCAG-3' (anti-sens) ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems). Des quantités connues (1.5×10^{-7} à $1.5 \times 10^{-10} \text{ g/l}$) d'un vecteur de clonage pGEM-T easy comportant le fragment 161-bp spécifique du gène sry (pGEM-Teasy-SRY161), générées au moyen de l'amplification en chaîne par polymérase avec les amorces spécifiques du chromosome Y décrites ci-dessus, ont été utilisées comme étalon interne de l'efficacité et de la spécificité de l'amplification. Le nombre absolu de cellules survivantes comparé au nombre de celles initialement greffées a été extrapolé de la courbe d'étalonnage établie à partir de dilutions d'ADN génomique extrait de nombres connus de cellules de rats mâles (2.5×10^6 à 10×10^6) injectées dans un groupe séparé de

cœurs infarcis de femelles. La corrélation entre le nombre de cellules injectées et la quantité de produits sry de la PCR était excellente ; pour des effectifs de 2.5, 5, 7.5 et 10×10^6 cellules, la quantité de fluorescence (mesurée en triple exemplaire pour chaque lot de cellules) a atteint les valeurs moyennes de respectivement 2.62×10^{-2} , 6.16×10^{-2} , 9.83×10^{-2} et 14.2×10^{-2} (précision de l'ajustement, 0.84).

Analyse des données

L'ensemble des études fonctionnelles et histologiques a été réalisé en aveugle. En raison du caractère inapproprié de l'hypothèse d'une distribution gaussienne des valeurs étant donné le faible effectif des échantillons, des tests non paramétriques ont été utilisés pour la comparaison entre les groupes et pour les différences au sein des groupes (respectivement tests de Mann-Whitney et Wilcoxon). Pour la même raison, les résultats sont exprimés sous forme de valeurs médianes (minimales- maximales). Le niveau critique α a été établi à 0,05 et la méthode de Holm a été utilisée pour l'ajustement en fonction des comparaisons multiples.

Résultats

Caractérisation des cellules injectées

Au moment de la greffe, le pourcentage de cellules myogéniques, évalué à l'aide d'une coloration positive à la desmine, était de 38,6 %. Le taux de viabilité après décongélation, évalué par exclusion au bleu de trypan, était de 91 %.

Résultats fonctionnels

Les FE initiales déterminées par échographie, exprimées sous forme de valeurs médianes, variaient entre 30,6 % et 41,6 % mais elles n'étaient pas significativement différentes entre les

groupes, comme l'ont montré les tests non paramétriques. En revanche, un mois après la greffe, il est apparu des effets thérapeutiques marqués (Figure 1), qui peuvent se résumer comme suit : la FE a diminué par rapport à sa valeur initiale dans les cœurs témoins (de 38,7 % [31,6 %-44,9 %] à 29,1 % [8,5 %-46,8 %] ; diminution relative, -20,7 %) et dans les cœurs ayant reçu du HIF-1 α (de 40,4 % [27,9 %-43,9 %] à 34,4 % [13,3 %-46,1 %] ; diminution relative, -14,9 %). En revanche, la FE ne s'est pas dégradée avec le temps, après les injections de myoblastes squelettiques, qu'ils aient été administrés seuls (avant, 30,6 % [24,8 %-40,7 %] ; après, 34,9 % [24,7 %-57,3 %] ; augmentation relative, 5,6 %) ou en association avec le HIF-1 α administré séquentiellement (avant, 35,2 % [27,1 %-42,8 %] ; après, 37,0 % [19,7 %-48,6 %] ; augmentation relative, 2,2 %) ou avec le vecteur adénoviral vide (avant, 41,6 % [24,6 %-45,2 %] ; après, 41,5 % [25,1 %-42,1 %]), bien que le faible effectif de ce dernier échantillon limite l'importance des conclusions. La modification la plus étonnante est survenue dans le groupe recevant l'administration concomitante de myoblastes et de HIF-1 α ; en effet, la FE a augmenté de façon très importante au-dessus des niveaux initiaux (avant, 34,9 % [25,0 %-44,3 %] ; après, 44,8 % [22,9 %-56,2 %] ; augmentation relative, 27,6 %), à tel point qu'au bout d'un mois, elle était nettement plus élevée que dans tous les autres groupes, la différence étant significative par rapport aux animaux témoins et aux cœurs ayant reçu le HIF-1 α (respectivement $P = 0,0001$ et $P = 0,001$). Cette amélioration était principalement liée à des variations moindres des volumes télésystoliques du VG (Tableau 1), qui n'ont augmenté que de 7,7 % par rapport à la valeur initiale dans les cœurs recevant des myoblastes et du HIF-1 α ; un pourcentage respectivement 10, 7 et 4 fois plus faible que ceux observés chez les témoins, les cœurs traités par le HIF-1 α et les cœurs recevant une greffe de myoblastes. Inversement, il n'y a aucun effet lié au traitement sur le processus de remodelage post infarctus, comme le montre l'augmentation comparable des volumes diastoliques du VG dans les différents groupes étudiés (Tableau 1).

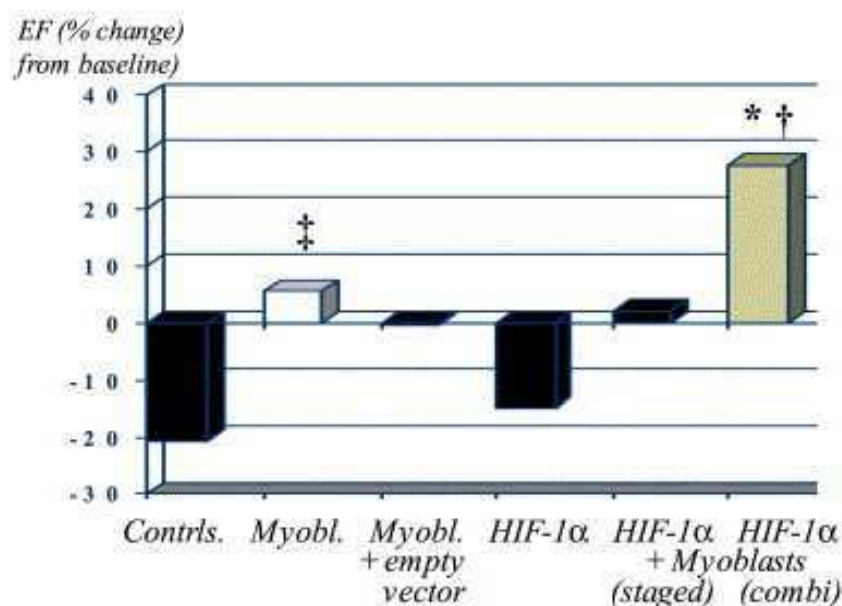


Figure1. FE après greffe *Témoins*, Animaux témoins ; *myobl*, myoblastes. Le groupe *par étapes* correspond à l'injection de HIF-1α au moment de l'infarctus suivie, huit jours plus tard, de la greffe de myoblastes ; le groupe *combi* correspond à l'administration concomitante de HIF-1α et des myoblastes huit jours après l'infarctus du myocarde. * $P = 0,0001$ pour la comparaison avec les animaux témoins, $P = 0,001$ pour la comparaison avec HIF-1α (après ajustement en fonction de l'analyse de comparaison multiple). † $P = 0,03$ pour la comparaison avec les myoblastes (non statistiquement significatif après ajustement en fonction de l'analyse de comparaison multiple). ‡ $P = 0,006$ pour la comparaison avec les animaux témoins, $P = 0,03$ pour la comparaison avec HIF-1α (non statistiquement significatif après ajustement en fonction de l'analyse de comparaison multiple).

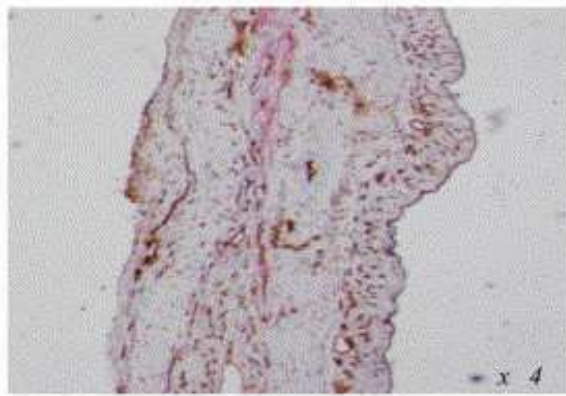
TABEAU 1. Modifications des volumes ventriculaires gauches

Groupe	VTD (ml)		VTS (ml)	
	Valeur initiale	Après greffe	Valeur initiale	Après greffe
Témoin (n = 11)	0,40 (0,32-0,49)	0,55 (0,41-1,08)	0,25 (0,20-0,32)	0,40 (0,22-0,86)
Myoblastes (n= 13)	0,43 (0,26-0,53)	0,53 (0,34-0,99)	0,30 (0,15-0,39)	0,37 (0,14-0,73)
Myoblastes + vecteur vide (n = 3)	0,44 (0,36-0,47)	0,64 (0,41-0,64)	0,24 (0,21-0,35)	0,37 (0,24-0,47)
HIF-1α (n = 7)	0,37 (0,30-0,44)	0,50 (0,36-0,75)	0,22 (0,17-0,30)	0,30 (0,24-0,65)
Myoblastes + HIF-1α (par étapes, n = 9)	0,38 (0,28-0,58)	0,63 (0,34-0,82)	0,27 (0,16-0,41)	0,38 (0,21-0,59)
Myoblastes + HIF-1α (associés, n = 13)	0,41 (0,28-0,51)	0,50 (0,38-1,08)	0,24 (0,19-0,38)	0,28 (0,18-0,83)

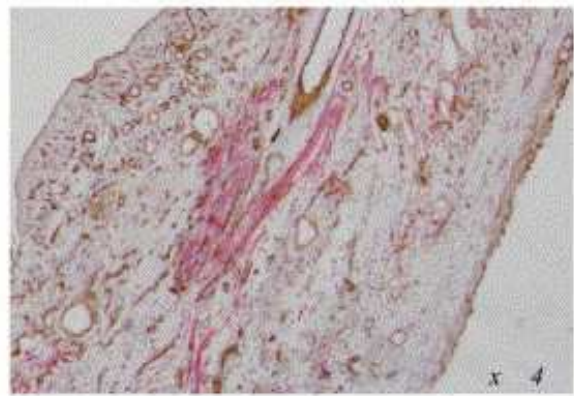
Les données sont exprimées sous forme de valeurs médianes (minimales- maximales) Dans le groupe traité par étapes, le facteur de transcription induit par l'hypoxie 1α a été injecté au moment de l'infarctus (c'est-à-dire huit jours avant la greffe de myoblastes) ; dans le groupe associé le facteur de transcription induit par l'hypoxie 1α et les myoblastes ont été injectés simultanément huit jours après l'infarctus du myocarde. VTD, volume télédiastolique ; VTS, volume télésystolique ; HIF-1α, facteur de transcription induit par l'hypoxie 1α.

Prise de la greffe cellulaire et angiogenèse

Des groupes de myoblastes ont été identifiés par histologie sous la forme de grands myocytes multinucléés et principalement par immunohistochimie sous la forme de myocytes colorés positivement pour les chaînes lourdes de myosine au centre et sur les bords de la région traitée. Dans le groupe recevant simultanément des myoblastes et le HIF-1 α , la prise de la greffe cellulaire a été associée à une angiogenèse significativement plus importante au cœur de l'infarctus et le long de ses bords comportant du myocarde normal, comparativement à ce qui a été observé dans le groupe traité par myoblastes seuls (Figure 2), le nombre de capillaires par unité de champs étant de respectivement $8,5 \times 10^{-4}$ ($4,6 \times 10^{-4}$ - $1,1 \times 10^{-3}$) et $5,3 \times 10^{-4}$ ($3,8 \times 10^{-4}$ - $6,5 \times 10^{-4}$), ($P = 0,023$). L'amplitude de la prise de la greffe cellulaire dans les régions cicatricielles ayant reçu une injection a également été supérieure dans le groupe associé par rapport à celui recevant des myoblastes seuls, comme le montre le pourcentage de zones positives à la myosine par rapport à la région infarctée du VG qui est de 4,49% (0,44%-18,35%) dans le groupe associé contre 0,95% (0,16%-7,21% [$P = 0,027$]) dans l'autre groupe. Aucune formation tumorale n'a été enregistrée dans les cœurs étudiés.



M y o b l a s t



M y o b l a s t + H I F

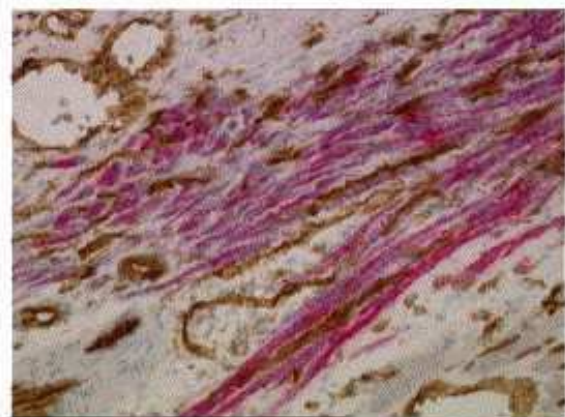
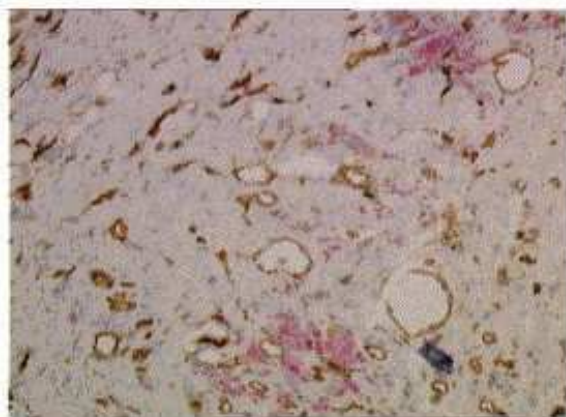


Figure 2. Image représentant un cœur ayant reçu une greffe de myoblastes (colonne de gauche) et un cœur traité à la fois par des myoblastes et par le HIF-1 α (colonne de droite). À un grossissement plus important (20 x), les degrés plus importants d'angiogenèse (coloration brune) et de prise de greffe cellulaire positive à la myosine squelettique rapide (coloration rouge) sont clairement visibles sur le cœur recevant le traitement associé.

Survie cellulaire

Dans le sous-groupe d'animaux chez lesquels des myoblastes mâles ont été injectés à des receveurs femelles, le nombre de cellules greffées, identifiées par la présence d'un chromosome Y à la PCR, était également significativement plus important après les injections simultanées de myoblastes et de HIF-1 α qu'après la greffe cellulaire isolée : $13,16 \times 10^6$ ($3,45 \times 10^6 - 20,89 \times 10^6$) contre $1,56 \times 10^6$ ($0,67 \times 10^6 - 3,42 \times 10^6$ [P = 0,020, n = 4 pour chaque groupe]).

Discussion

Principaux résultats de l'étude

Le résultat le plus pertinent de la présente étude est l'amélioration plus importante de la fonction systolique du VG après infarctus en cas d'administration intramyocardique simultanée de HIF-1 α et de myoblastes squelettiques comparativement à une greffe isolée de myoblastes ; cette amélioration a été corrélée à une augmentation de l'angiogenèse et de la survie cellulaire dans la région greffée. Inversement, l'administration de HIF-1 α au moment de l'infarctus n'a pas montré de bénéfice comparable, probablement en raison d'une inactivation adénovirale par des processus inflammatoires et immunitaires (il est possible que l'effet immunosuppresseur de la ciclosporine ne soit pas encore efficace au moment de l'injection du HIF-1 α parce qu'elle vient d'être instaurée). Cette hypothèse a été indirectement confortée par la littérature, avec une étude dans laquelle l'administration séquentielle du facteur fibroblastique de croissance basique et de cardiomyocytes fœtaux (administrés une semaine plus tard) s'est soldée par un succès fonctionnel. Le facteur était incorporé dans des hydrogels à base de gélatine à libération progressive (Sakakibara 2002), ce qui a pu offrir une certaine protection contre les processus d'inactivation environnementaux. En revanche, Retuerto (Retuerto 2004) a récemment rapporté que des injections intramyocardiques d'un

adénovirus codant pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) au moment de l'infarctus amélioreraient les bénéfices de la greffe de cardiomyocytes fœtaux pratiquée trois semaines plus tard. Plusieurs différences dans la conception du protocole, en particulier l'utilisation d'animaux syngéniques dans les expériences de Retuerto, pourraient expliquer cette disparité avec nos données. De plus, l'absence de bénéfice fonctionnel dans des cœurs ayant reçu une injection isolée de HIF-1 α confirme la prédiction selon laquelle l'augmentation de l'angiogenèse dans un tissu cicatriciel qui n'héberge plus de cardiomyocytes dépendant du flux sanguin est peu susceptible d'affecter les caractéristiques contractiles de cette région fibreuse. Cette hypothèse est effectivement étayée par l'observation selon laquelle le groupe qui a obtenu les meilleurs résultats fonctionnels était celui dans lequel le HIF-1 α était administré simultanément avec des cellules vivantes (c'est-à-dire les myoblastes greffés), dont la survie est supposée bénéficier de l'angiogenèse.

Importance et prévention de la mort cellulaire après la greffe

La perte des cardiomyocytes peut atteindre 90 % des cellules greffées dans les 48 premières heures (Zhang 2001); un taux de perte comparable a été observé sur des myoblastes squelettiques greffés dans un muscle squelettique (Tremblay 2001) ou dans des régions myocardiques infarctées (observations non publiées de notre laboratoire). Cette perte importante de cellules greffées est susceptible d'entraver de manière importante l'efficacité fonctionnelle de la technique, comme le suggère la relation étroite établie dans un modèle d'infarctus myocardique du rat entre le nombre de myoblastes injectés et l'étendue de la préservation du ventricule gauche (Tambara 2003).

Une première approche consiste à augmenter le nombre de cellules pour compenser la perte des cellules greffées, mais cette stratégie se heurte à des contraintes en termes de faisabilité (la durée des cultures doit rester dans la limite clinique acceptable de deux à trois semaines),

de coût et de sécurité : le volume tolérable qui peut être injecté dans le myocarde ne doit probablement pas excéder 5 à 6 ml, tandis que les passages multiples pourraient favoriser l'émergence d'une population de cellules à la différenciation défectueuse entraînant un risque ultérieur de prolifération inappropriée de la greffe (Reinecke 2000). Une autre approche vise l'amélioration de la survie cellulaire par neutralisation des mécanismes de perte de cellules greffées.

Ces mécanismes sont probablement multiples, mais en dehors des contraintes physiques au cours des injections et de la réaction inflammatoire déclenchée par les piqûres de l'aiguille, deux mécanismes semblent jouer un rôle majeur : l'apoptose, comme le montrent les bénéfices de la transfection des cellules souches mésenchymateuses avec un gène favorisant la survie (Akt) avant la greffe (Askari 2003), et l'ischémie, comme le montre la multiplication par deux de la survie cellulaire lorsque les injections sont effectuées dans un tissu richement vascularisé par opposition à un tissu cicatriciel fibreux (Zhang 2001). Les résultats de notre groupe associant les myoblastes et le HIF-1 α étayent le concept selon lequel l'amélioration de la perfusion vasculaire des cellules greffées optimise les résultats fonctionnels après la greffe en agissant sur la composante ischémique de la perte cellulaire par accroissement de l'angiogenèse.

En ce sens, nos données sont conformes à celles d'études précédentes qui ont établi les bénéfices de l'ajout d'un apport supplémentaire de facteurs de croissance angiogéniques à la greffe cellulaire. Ainsi, il a été montré que tant la surexpression induite génétiquement du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire par les myoblastes squelettiques (Suzuki 2001, Yau 2004) ou des cellules souches embryonnaires à différenciation précoce (Yang 2002) que l'administration séquentielle du facteur fibroblastique de croissance et de cardiomyocytes fœtaux (Sakakibara 2002) augmentaient l'angiogenèse et amélioraient la fonction comparativement aux résultats obtenus chez les animaux témoins. Cependant, il est

maintenant reconnu que l'administration d'un seul facteur de croissance angiogénique a une efficacité thérapeutique limitée (Hughes 2004), ce qui justifie donc l'administration d'un mélange de plusieurs facteurs ou, mieux, d'un gène de survie qui peut réguler l'expression d'une grande variété d'effecteurs en aval. Dans ce contexte, le HIF-1 α est intéressant en raison de son rôle de régulateur essentiel de l'expression génique en réponse à l'hypoxie cellulaire et de la multiplicité des gènes qu'il active par transcription (> 80) qui produisent des protéines jouant un rôle crucial dans l'angiogenèse (en particulier grâce à la production de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et d'érythropoïétine), la protection cellulaire et les mécanismes métaboliques (en particulier le transport du glucose et la glycolyse) (Semenza 2002). En conséquence, si le HIF-1 α seul n'a pas réussi à éviter une détérioration de la fonction VG, l'observation selon laquelle son administration concomitante avec les myoblastes squelettiques a potentialisé les bénéfices liés aux cellules (Figure 2) suggère une action synergique et donc une contribution de la myogenèse et de l'angiogenèse à l'amélioration des résultats fonctionnels constatés dans le groupe de traitement associé.

Limites

Plusieurs limites de l'étude doivent, cependant, être reconnues. Tout d'abord, la preuve de l'efficacité du HIF-1 α s'appuie principalement sur des critères d'évaluation de substitution comme la densité capillaire et des indices fonctionnels du VG parce que nous n'avons pas mesuré directement l'expression du HIF-1 α dans le tissu myocardique. Cependant, la capacité d'un adénovirus à agir comme vecteur efficace du HIF-1 α a précédemment été démontrée par la régulation positive d'une grande variété de gènes dépendants de ce facteur dans des cellules cardiaques humaines transfectées par ces constructions (Jiang C. 2002).

Deuxièmement, dans cette étude, le HIF-1 α codant pour des gènes a été administré par un vecteur adénoviral en solution injecté conjointement avec les myoblastes. Il reste donc possible qu'une meilleure efficacité thérapeutique puisse être obtenue par d'autres modes d'administration des gènes (transfection directe de myoblastes et ADN plasmidique nu) ou greffe concomitante de cellules présentant un potentiel angiogénique (Jiang 2002) (Kim) (Ott 2004).

Troisièmement, nos données par PCR ont montré un nombre de cellules portant le chromosome Y dans le groupe de traitement associé presque trois fois supérieur à celui du groupe des myoblastes seuls. Ceci reflète probablement une amélioration de la survie des myoblastes mieux vascularisés, comme le suggère la plus grande étendue des régions positives à la myosine squelettique observée dans ces cœurs ayant reçu l'association de myoblastes et de HIF-1 α . Néanmoins, en l'absence de caractérisation phénotypique détaillée, nous ne pouvons exclure que la prolifération de composés cellulaires non myogéniques de l'injectat initial (c'est-à-dire fibroblastes et cellules endothéliales) puissent également avoir contribué à cette numération cellulaire plus importante.

Enfin, le suivi était limité à un mois. La demi-vie relativement courte des vecteurs adénoviraux soulève alors la question des effets à long terme du traitement par le HIF-1 α . Cependant, la plupart des décès cellulaires surviennent peu de temps après les injections à un moment où le HIF-1 α est encore présent pour déclencher une augmentation de l'angiogenèse ; on peut donc supposer que celle-ci persiste dans le temps, même lorsque le déclencheur a disparu.

Conclusion

Les données présentes montrent que les bénéfices fonctionnels de la greffe de myoblastes squelettiques peuvent être considérablement améliorés par l'administration concomitante d'un vecteur adénoviral codant pour le HIF-1 α ; elles confirment le rôle important joué par l'ischémie dans la genèse de la mort cellulaire après une greffe et suggèrent qu'une amélioration de la vascularisation de celle-ci est un moyen efficace de résoudre ce problème. La pertinence clinique potentielle de ces résultats doit être confirmée après l'approbation de l'utilisation expérimentale du HIF-1 α dans des essais de phase I chez l'homme. Plus généralement, ces résultats démontrent également les bénéfices qu'il est possible de tirer des effets synergiques des thérapies géniques et cellulaires.

Le troisième protocole était destiné à détecter la présence de cellules progénitrices adultes multipotentes de la moelle osseuse (multipotent adult progenitor cells ou MAPC), après leur transplantation dans le myocarde infarci. Les résultats confirment qu'aucune cellule ne se transforme en cellules présentant des caractéristiques musculaires et aucune cellule ne peut être détectée à distance de la greffe. Le résultat fonctionnel sur des rats transplantés est proche des résultats des autres lignées : une stabilisation des fractions d'éjection, par rapport à la détérioration de la fonction myocardique observée sur le groupe contrôle.

3- Les cellules progénitrices adultes multipotentes dérivées de la moelle osseuse peuvent-elles permettre la régénération du myocarde après un infarctus ?

Apport personnel pour ce travail, publié : Cardiovasc Res. 2006 Oct 1;72(1):175-83. (cf chapitre IX) :

- chirurgie et anesthésie de tous les animaux opérés
- préparation des échantillons après sacrifice des animaux
- collecte des données

Collaborations et aides pour l'élaboration du projet :

- Onnik Agbulut : collaboration active pour toutes les manipulations en laboratoire, responsable du DEA et de la conduite des manipulations
- Alain Hagège, Laurent Sabbah et Christophe Bressolle : cardiologues référents de l'étude pour les échocardiographies
- Professeur Philippe Menasché : directeur du travail

« Les cellules progénitrices adultes multipotentes dérivées de la moelle osseuse peuvent-elles permettre la régénération du myocarde après un infarctus ? »

Introduction

Depuis les dix dernières années, la thérapie cellulaire est apparue comme une nouvelle voie de recherche pour espérer une réparation du myocarde endommagé. Les myoblastes squelettiques (Menasché 2003, Herreros 2003, Siminiak 2004, Smits 2003) ainsi que les cellules de la moelle osseuse (Mathur 2004) sont tous les deux en phase d'essais cliniques. Cependant, alors qu'il existe des preuves irréfutables que ces deux types de cellules peuvent limiter le remodelage au cours du post-infarctus et augmenter l'angiogenèse, il n'existe par contre aucune preuve solide démontrant qu'elles peuvent se transdifférencier en cardiomyocytes (Reinecke 2002, Murry 2004, Balsam 2004). À partir de là, on peut se demander si elles seraient capables de réellement régénérer le myocarde après un infarctus. C'est dans ce contexte, qu'en 2001, la caractérisation d'une sous-population de cellules adultes dérivée de la moelle osseuse et créditée d'un potentiel de différenciation à lignée multiple (Reyes 2001, Jiang Y.2002, Reyes 2002, Jiang Y. 2003, Schwartz 2002), aussi appelée cellules progénitrices adultes multipotentes de la moelle osseuse : multipotent adult progenitor cells (MAPC) a donné l'espoir de l'utilisation de ces cellules à des fins thérapeutiques et régénératives. Alors que des études in vitro ont clairement permis de démontrer la capacité des cellules MAPC à se différencier en cellules des trois couches germinales, nous ne savons que peu de choses sur leur devenir phénotypique après greffe dans le myocarde endommagé par un infarctus. De plus, bien que les cellules MAPC se différencient en cellules cardiaques lorsqu'elles sont injectées dans le blastocyste et

contribuent ainsi au développement du cœur (Jiang Y. 2002), il n'existe aucune publication démontrant que les cellules MAPC se différencient en cardiomyocytes *in vivo*. Toutes ces questions restées sans réponse nous ont poussés à entreprendre cette étude, dans le but d'examiner le potentiel des cellules MAPC afin de contribuer à la régénération du muscle cardiaque sur un modèle d'infarctus chronique du myocarde.

Méthodes

Modèle expérimental

Après avoir pratiqué une thoracotomie gauche (Al Attar 2003), nous avons ligaturé l'artère interventriculaire antérieure de femelles rats Sprague–Dawley (Harlan-France), âgées de 8 semaines. Quatorze jours plus tard, ces rats ont été réopérés par une sternotomie. Ils ont été randomisés pour recevoir en moyenne 3 injections dans la cicatrice (volume total de 150 µl), une dans la zone centrale et deux en limite de la zone d'infarctus, soit de cellules rat multipotent adult progenitor cells (rMAPC) (5×10^6 , n=25) soit un milieu de culture (n=19). La viabilité après décongélation évaluée selon la technique de FACS utilisant l'exclusion par iodure de propidium, était régulièrement supérieure à 87%. Tous les rats ont reçu de la cyclosporine A (10 mg/kg/j, i.p., Novartis) 2 jours avant la greffe et tous les jours jusqu'à leur sacrifice. Tous ces tests ont été réalisés conformément aux "Principles of Laboratory Animal Care" décrits par la comité national en charge de la recherche médicale (National Society for Medical Research) et le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Recommandations pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire) préparé par « l'Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council », et publié par la « National Academy Press », révision 1996. Toutes les procédures

sur animaux ont reçu l'accord du University of Navarra Institutional Committee on Care and Use of Laboratory Animals.

Isolation, préparation et caractérisation des cellules rMAPC greffées

Les cellules rMAPC ont été obtenues à partir de moelle osseuse de rats adultes Sprague–Dawley. Elles ont été isolées et caractérisées comme indiqué précédemment (Reyes 2001, Jiang Y. 2002, Reyes 2002, Jiang Y. 2003, Schwartz 2002), en y apportant des modifications mineures. En résumé, les cellules mononuclées dérivées de moelle osseuse ont étéensemencées à une concentration de 1×10^6 cellules/cm² sur un milieu en expansion, additionné de 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (Sigma), 10 ng/ml de facteur de croissance dérivé des plaquettes (système R et D) et de 10 ng/ml de facteur d'inhibition de la leucémie dans des boîtes de culture enduites de 10 ng/ml de fibronectine (Sigma). Le milieu d'expansion était constitué de 58% de DMEM teneur basse en glucose (Gibco BRL), 40% de MCDB-201 (Sigma), 2% de sérum fœtal de veau (Biochrom), de 1X insuline transferrine sélénium, 1X d'albumine de sérum bovin et acide linoléique (Sigma), 10^{-8} M dexaméthasone (Sigma), 10^{-8} M d'acide ascorbique 2-phosphate (Sigma), 100 U pénicilline, et 1000 U de streptomycine (Gibco). Le milieu a été changé tous les 3 à 4 jours et les cultures ont été conservées jusqu'à l'obtention d'agrégats cellulaires collés confluents à plus de 50%. Elles ont été détachées à l'aide d'une solution à 0.25% de trypsine et EDTA (BioWitthaker) et réensemencées à une concentration de 5×10^2 /cm² dans les mêmes conditions de culture. Le même niveau de confluence des cellules a été maintenu tout au long de la culture. Les cellules rMAPC ont été caractérisées par la technique de FACS après coloration par anticorps monoclonaux anti-CD44, antigène de classe I du MHC, anti-SSEA1, anti-SSEA4, anti-CD45, anti-CD90, anti-CD73, anti-CD106, anti-CD31 et anti-CD49b. Les rMAPC ont été transduites avec un vecteur lentiviral de troisième génération exprimant le gène eGFP cDNA à une

multiplicité d'infection cellulaire naturelle (MOI) de 50 en présence de polybrene (4 µg/ml). La transduction des cellules a pu être réalisée après 50 doublements de population (DP). La cytométrie de flux a permis d'établir que plus de 50% des cellules MAPC étaient positives à l'eGFP. Pour un des groupes, les rats ont été greffés avec des cellules d'eGFP rMAPC marquées au ferucarbotran (Resovist, Schering AG, Allemagne) à une concentration de 25 µg fer/ml pendant 24h, comme décrit (Arbab, Transplantation 2003). L'efficacité du marquage à l'oxyde de fer super paramagnétique (OFS) était supérieure à 98%. Toutes les cellules ont été congelées avant transplantation.

Analyse fonctionnelle

Les animaux ont été anesthésiés par isofluorane pour permettre l'étude de la fonction du VG par échocardiographie en 2D, juste avant la transplantation et 1 mois après. L'échocardiographie transthoracique en 2D a été réalisée grâce à une sonde à balayage linéaire de 13 à 15 MHz (15L8), disponible sur le marché, et spécialement conçue pour les études cardiaques par ultrasons chez le rat, connectée à un échographe numérique (Sequoia 512®, Acuson Corp, Mountain View, CA, USA). Les animaux ont été placés sur tapis chauffant en décubitus dorsal ou en position latérale. Les vues grand axe de fin de diastole et fin de systole du VG ont été standardisées de la manière suivante : inclusion de l'apex, du muscle papillaire postérieur, de la valve mitrale, et de la racine aortique. Les mesures échocardiographiques en deux dimensions ont été respectivement enregistrées en mode cine-loop pour obtenir une image correcte de cœurs battant rapide. Cet appareil permet d'obtenir un format maximal à une fréquence de 160 Hz avec une résolution latérale et axiale élevée. Les images numériques ont ensuite été analysées à un format plus lent afin de pouvoir capter les vraies phases de fin de diastole et de systole. Les surfaces télé-diastoliques et télé-systoliques (A) ont été obtenues par tracés manuels des contours endocardiques du VG sur le

cycle montrant la plus grande (et la plus petite) cavité du VG en mode ciné-loop, selon la méthode de pointe recommandée par l'American society of echocardiography. A partir de ces formats, le traçage d'une ligne reliant la partie la plus distale de l'apex et le centre d'une ligne reliant les charnières de l'anneau mitral a permis de déterminer les longueurs (L) de fin de diastole (ou fin de systole) du VG. Les volumes de fin de diastole et de fin de systole (respectivement LVEDVs et LVESVs) ont ensuite été calculés selon la méthode de surface-longueur monoplan ($\text{volume} = \frac{8}{3} \times A^2 \times L$). La fonction d'éjection du ventricule gauche (FEVG, %) a été calculée selon la formule $((\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / \text{LVEDV}) \times 100$. La moyenne des mesures a été lissée sur 3 cycles cardiaques consécutifs et analysée en aveugle par un observateur unique. La variabilité entre valeurs lors des échocardiographies a été analysée à partir de 2 séries de mesures initiales chez 10 rats pris au hasard, selon l'analyse de Bland et Altman: les résultats étaient très similaires pour les mesures linéaires ($r > 0,95$, $\text{SEE} < 0,1 \text{ mm}$), le volume ($r > 0,93$, $\text{SEE} < 0,08 \text{ ml}$), et la FE ($r > 0,95$, $\text{SEE} = 4\%$). Seuls les rats dont l'ampleur de l'infarctus était telle que la FEVG était inférieure à 40% de la valeur initiale ont été inclus dans l'étude afin d'optimiser les effets potentiels du traitement.

Analyse histologique et immunohistochimique

Les cœurs explantés ont été coupés en 3 blocs distincts : apical, médio-ventriculaire et basal. Ces blocks ont été soit congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide ou inclus dans de la paraffine. A partir de chaque bloc congelé, nous avons préparé vingt cinq lames de 7 μm , sur des coupes transverses du cœur, contenant chacune 3 cryo-coupes (10 à partir des blocs apical et de la cavité du mésencéphale, 5 à partir du bloc le plus basal) afin de réaliser une analyse histologique (hématoxyline et éosine) et immunohistologique. Les blocs inclus dans la paraffine ont été coupés en section de 3 μm d'épaisseur, déparaffinés et colorés par les anticorps appropriés. La détection des cellules greffées était essentiellement basée sur la

présence de signaux positifs à l'eGFP (1:400, anticorps polyclonaux de lapin [pAb], Interchim.; 1:300 sonde moléculaire pAb) alors que la présence de particules d'oxyde de fer dans les cellules a été détectée par la coloration au bleu de Prusse comme décrit ci-après (Arbab, Radiology 2003). Par la suite, l'étiquetage immunologique a été réalisé à l'aide d'anticorps dirigés contre la chaîne lourde de myosine (MyHC) (1:10, anticorps monoclonaux de souris [mAb], NovoCastra), de myosine liée à la protéine C (1:200, pAb, fourni par L. Carrier, Inserm U582, France), d'anticorps anti-cavéolin-1 α (1:50, pAb, Santa-Cruz), d'actine du muscle lisse (non-dilué, mAb, Dako), de connexine 43 (1:200, mAb, Sigma), de calponine (1:200, mAb, Sigma), de tropomyosine (1:100, mAb, Sigma) et de lectine BSL-1 (10 μ g/ml, Sigma).

Afin de quantifier la densité capillaire, 9 coupes par cœur ont été sélectionnées au hasard en périphérie, et colorées par les anticorps anti-cavéolin-1 α . La densité des artérioles a été quantifiée après coloration par les anticorps anti actine du muscle lisse. Au total, 9 coupes par cœur ont été choisies au hasard afin de dénombrer le nombre d'artérioles positives à l'actine du muscle lisse. Les images ont été analysées à l'aide du microscope Leica DMRB équipé d'optiques permettant l'épifluorescence. Les images digitales ont été analysées grâce au logiciel Vision explorer (Graftek Imaging). Les données sont exprimées comme étant le nombre de capillaires ou d'artérioles par mm².

Etude ultra structurale

Afin de réaliser des études par microscope électronique, le cœur a été fixé dans du glutaraldéhyde à 2%. Les coupes ont ensuite été fixées dans de l'osmium à 0,5%, puis rincées, déshydratées et incluses dans de l'Araldite (Durcupan, Fluka). Les coupes semi-épaisses (1,5 μ m) ont été réalisées avec un couteau à pointe diamant et légèrement colorées avec du bleu de toluidine à 1%. Les coupes semi-épaisses ont été incluses à nouveau dans un bloc d'Araldite

et détachées de la surface en verre par une succession de gel (azote liquide) et dégel. Les blocs faits à partir de coupes semi-épaisses ont ensuite été découpés en coupes ultra-minces (0,05 µm) à l'aide d'un couteau à pointe diamant et colorés au citrate de plomb avant d'être examinés sous microscope électronique Jeol 100CX.

Amplification par « polymerase chain reaction » (PCR)

L'ADN a été extrait du cœur entier (n=9 par groupe) après digestion à la protéinase K et extraction au phénol. L'ACP a été réalisé à l'aide d'une amorce d'eGFP (colonne montante - 5'- TAC GGC AAG CTG ACC CTG AA-3'; colonne descendante-5'-ATG CCG TTC TTC TGC TTG TC-3'). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 95 °C pendant 3 min, puis 30 cycles à 90 °C pendant 60 s, 62 °C pendant 60 s, 72 °C pendant 60 s, suivi d'une prolongation à 72°C pendant 10 min. Tous les échantillons ont aussi été soumis à l'amplification pour détecter la présence du gène GAPDH comme témoin de la présence d'un ADN amplifiable.

Statistiques

La taille de l'échantillon étant petite, il n'était pas possible d'estimer que les données seraient normalement distribuées. En conséquence, les données ont été comparées selon le test non paramétrique de Wilcoxon. Les résultats sont donc exprimés en valeurs médianes et intervalles de confiance. Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme significative (Tableau 1).

Résultats

Sur les 44 rats disponibles pour cette étude, 20 (rMAPCs transduites par la protéine eGFP: 9; témoins: 11) ont subi les études fonctionnelles avant et après la transplantation pendant que les 24 autres rats (rMAPCs transduites par la protéine eGFP: 16; témoins: 8) n'ont servi qu'à suivre par série l'évolution des cellules par immunohistochimie et microscope électronique (à 48 h, 1 semaine, 2 semaines et 4 semaines après la greffe ; pour chaque étape: 4 cœurs traités par rMAPC et 2 témoins).

Caractérisation des cellules rMAPC

Les cellules rMAPC ont été caractérisées après 50 doublements de population par cytométrie en flux, l'ACP en temps réel et la différenciation in vitro (Schéma 1). Les animaux ont été transplantés avec du CD44 faible et CMH classe I négatif, CD45 négatif et CD90 positif normaux sur le plan cytogénétique issues de la même moelle osseuse. Nous avons pu démontrer que les cellules rMAPCs se différenciaient in vitro en cellules exprimant les marqueurs phénotypiques des tissus issus du mésoderme (cellules musculaires endothéliales et squelettiques), de l'endoderme (hépatocytes) et de l'ectoderme (neurone) (schéma 1).

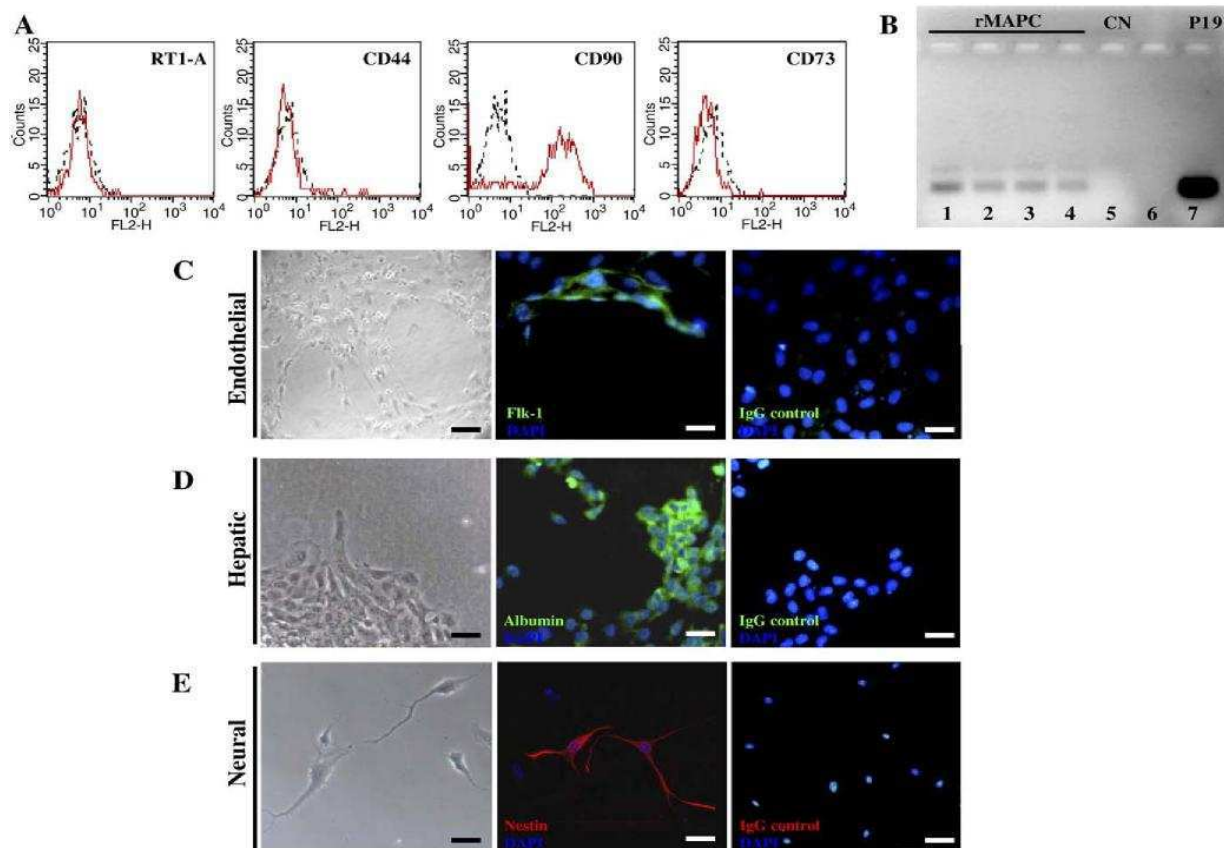


Schéma. 1. Caractérisation des rMAPC. (A) Phénotype FACS de rMAPC après 50 doublings de population (DP). Les graphiques montrent des anticorps d'isotypes témoin IgG colorés (tracé noir) versus des anticorps à coloration spécifique (tracé rouge). Un phénotype représentatif de plus de 5 essais est présenté; (B) l'immuno-transfert d'ACP en temps réel montre le profil d'expression le 4 octobre sur des cellules de rMAPC à DP 50. Ligne 1-4: rMAPC; Ligne 5-6 : témoin négatif; Ligne 7: ligne cellulaire P19 (témoin positif). (C-E) Différenciation in vitro de cellules rMAPCs. Micrographique de contraste – panneau de gauche –, immunofluorescence avec anticorps monoclonaux spécifiques – panneau central – et témoins Ig – panneau de droite – (C) Différenciation endothéliale: la morphologie des cellules rMAPC traitées par VEGF pendant 14 jours a été modifiée et l'expression régulée des marqueurs endothéliaux, comme mis en évidence par l'immunofluorescence (Flk-1, vert). (D) Différenciation des hépatocytes obtenue à partir de l'expression des cellules rMAPC des marqueurs hépatocytaires : l'expression des marqueurs hépatocytaires s'est régulée à la hausse après 21 jours et en présence des HGF et FGF-4, comme mis en évidence par l'immunofluorescence (albumine, vert). (E) Différenciation neuronale à partir des cellules rMAPC: l'expression des marqueurs neuronaux s'est régulée à la hausse après 21 jours et en présence de bFGF (1^{ère} semaine), Shh, FGF8 (2^{ème} semaine) et BDNF (3^{ème} semaine), comme mis en évidence par l'immunofluorescence (nestine, rouge). Les panneaux sur l'immunofluorescence sont des essais représentatifs supérieurs à 3. Le DAPI (bleu) sur les panneaux C, D et E a été utilisée pour la coloration du noyau. Echelle : 25 μ m.

Analyse fonctionnelle

Il n'y avait pas de variations significatives des FE initiales entre les 2 groupes (témoins : 30% [0,23;0,37]; rMAPC : 37% [0,32;0,38], $p=0,15$), semblant indiquer un traumatisme ischémique initiale de même envergure. Un mois plus tard, la FE du groupe témoin avait chuté à 24% [0,21;0,30] alors qu'elle semblait être mieux préservée suite à la greffe de cellule rMAPC (37% [0,27;0,41]). Cependant, la différence entre les deux groupes n'a pas permis d'atteindre le seuil de la signification statistique ($p=0,06$). Chaque valeur est donnée dans le Schéma 2.

Tableau 1 : Résumé des résultats fonctionnels

N		Valeur initiale	Post Tx	Delta (ml)	Delta (%)
EDV (ml)					
Témoins	11	0,49 [0,43;0,58]	0,70 [0,52;0,80]	0,18 [0,12;0,31]	38,97 [23,21;72,26]
rMAPC	9	0,50 [0,49;0,52]	0,54 [0,47;0,67]	0,06 [0,03;0,17]	15,90 [6,50;31,47]
Test de Wilcoxon		0,7103	0,0952	0,0562	0,0562
ESV (ml)					
Témoins	11	0,33 [0,28;0,43]	0,55 [0,32;0,61]	0,16 [0,08;0,27]	40,33 [17,13;81,45]
rMAPC	9	0,32 [0,31;0,37]	0,37 [0,31;0,40]	0,04 [0,04;0,09]	16,63 [10,29;28,33]
Test de Wilcoxon		0,8238	0,0674	0,0251	0,0251
FE (%)					
Témoins	11	30 [0,23;0,37]	24 [0,21;0,30]	0 [0,11;0,04]	1,05 [38,92;16,65]
rMAPCs	9	37 [0,32;0,38]	37 [0,27;0,41]	0,02 [0;0,04]	5,67 [1,00;9,50]
Test de Wilcoxon		0,1519	0,0674	0,4119	0,4119

Les valeurs sont indiquées comme valeurs médianes et [intervalle de confiance].

EDV: Volume en fin de diastole ; ESV: Volume en fin de systole; FE: fraction d'éjection; rMAPC: cellules progénitrices adultes multipotentes de la moelle osseuse de rat; PostTx: post-greffe; delta: différence entre les valeurs après la greffe et les valeurs initiales exprimées en valeur absolue; delta (%): différence entre les valeurs après la greffe et les valeurs initiales exprimée en pourcentage des valeurs initiales

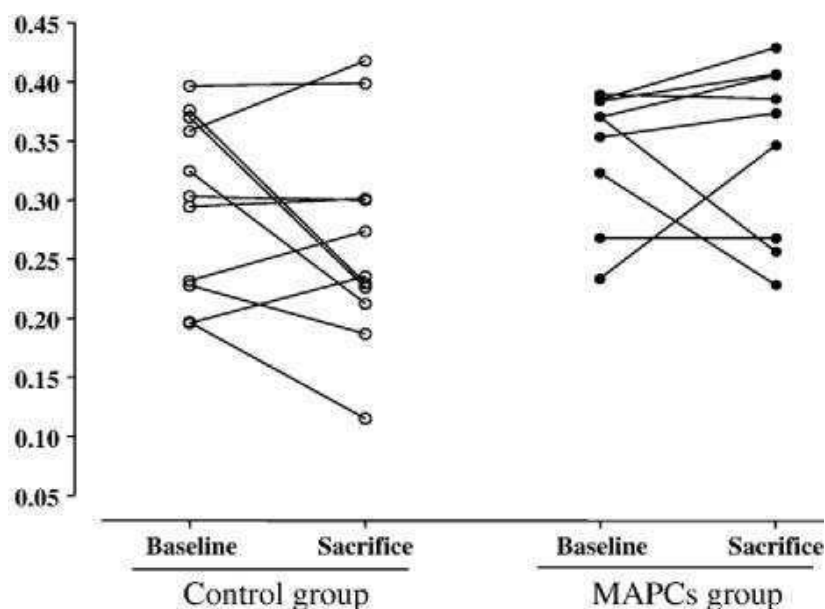


Schéma 2: Effets fonctionnelles des cellules rMAPC greffées. Valeurs individuelles pour la fraction d'éjection (FE) d'origine et avant le sacrifice.

Caractérisation phénotypique des cellules greffées

Dans le groupe des cœurs greffés avec des cellules rMAPCs, les cellules greffées ont pu être détectées à 48h, 1 semaine et 2 semaines. Toutefois, elles n'ont pas pu être identifiées par immunofluorescence, immunohistochimie ou ACP complétées respectivement par les anticorps anti-eGFP et les amorces eGFP, 1 mois après la greffe (schéma 3A–D).

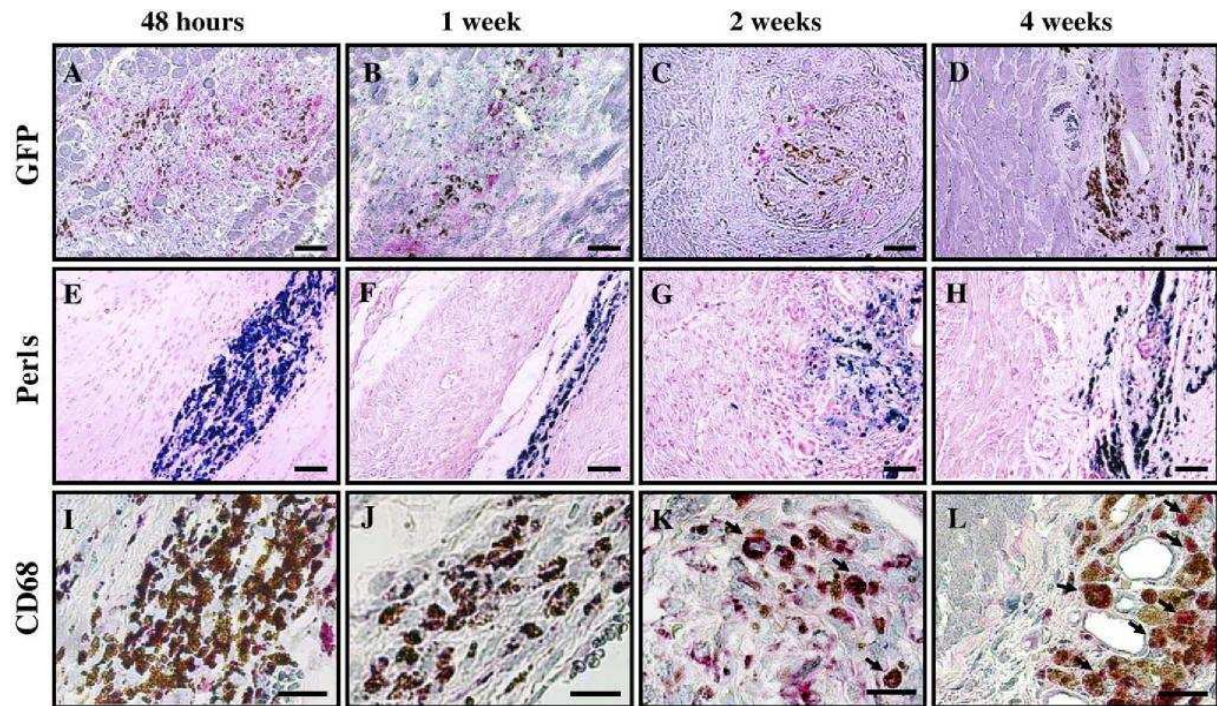


Schéma. 3. Détection de cellules rMAPC greffées sur des cœurs de rats. Les rats greffés avec 5×10^6 de fer étiquetés rMAPC-GFP⁺ ont été sacrifiés à différents intervalles et les coupes des cœurs ont été analysées par coloration au GFP (A à D) et Perls (E à H) à (A,E) 48 h; (B,F) 1 semaine; (C,G) 2 semaines et (D,H) 4 semaines; Les particules de fer ont été détectées jusqu'à 4 semaines (marron) (A à D) et les cellules positives au GFP jusqu'à 2 semaines, grâce au système de développement par phosphatase alcaline (fuchsia). La présence de particules de fer a été confirmée par coloration de Perls (bleu) (E–H). Aucune coloration positive à la GFP ou Perls n'a été observée dans le milieu témoin, le lysat des cellules marquées au fer et la solution de particules de fer des cœurs ayant reçu une injection (données non présentées ici). Nombre croissant de cellules positive au CD68 (fuchsia) localisées au même endroit que les particules d'ions (marron) (flèches) (I – L) à 2 et 4 semaines. Echelle: 50 μ m (A à H), 25 μ m (I à L).

Dans la série d'essais impliquant le Resovist, les cellules rMAPC marquées au Resovist à différentes concentrations n'ont pas modifié la prolifération cellulaire ou leur viabilité (données non publiées). Concernant les animaux greffés avec des cellules rMAPC marquées aux particules de fer, les cellules positives au fer ont pu être détectées à différents intervalles jusqu'à 1 mois après la greffe (schéma 3E–H). Ces cellules n'étaient pas colorées par des anticorps dirigés contre les antigènes cardiaques et antigènes spécifiques du muscle lisse (données non publiées). De plus, à aucun moment nous n'avons pu mettre en évidence de localisation commune entre les cellules positives à la protéine GFP et l'actine du muscle lisse (non publié ici). Cependant, 2 semaines après la greffe un certain nombre de cellules marquées au fer étaient positives aux marqueurs endothéliaux (BSL-1) (schéma 4).

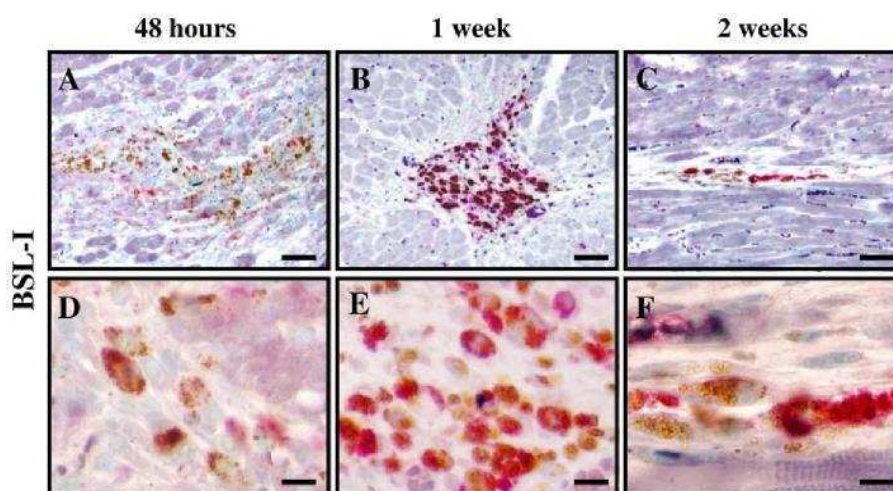


Schéma 4: différenciation endothéliale de cellules rMAPC transplantées. Coupes du cœur (3 µm) colorées par immunohistochimie avec des marqueurs endothéliaux, lectine BSL-1, à 48 h (A, D), 1 semaine (B, E) ou 2 semaines (C, F) après greffe de cellules. D à F sont des agrandissements de A à C. L'étiquetage double au BSL-I (fuchsia) et particules de fer (marron) à 1 et 2 semaines. Echelle : 50 µm (A à C), 10 µm (D à F).

Il est aussi intéressant de noter qu'à 4 semaines, les cellules marquées au fer étaient positives aux marqueurs macrophages CD68 alors qu'aucune coloration à la GFP ou à la lectine n'était détectable (schéma 3I–L). Les animaux témoins greffés avec une solution contenant des particules de fer dans un milieu ou un lysat de rMAPC marquées au fer n'ont montré aucune coloration de Perls positive (données non publiées).

L'analyse ultra-structurale a permis de mettre en évidence la présence de fer dans les lysosomes des cellules greffées à 48 h, 1 semaine (Fig. 5A, C) et 2 semaines après la greffe de cellules marquées démontrant ainsi la formation initiale de fibres. Il est aussi intéressant de noter que l'accumulation des macrophages chargés de particules de fer a été détectée 4 semaines après la greffe avec l'apparition d'autres types de cellules marquées au fer (schéma 5B, D).

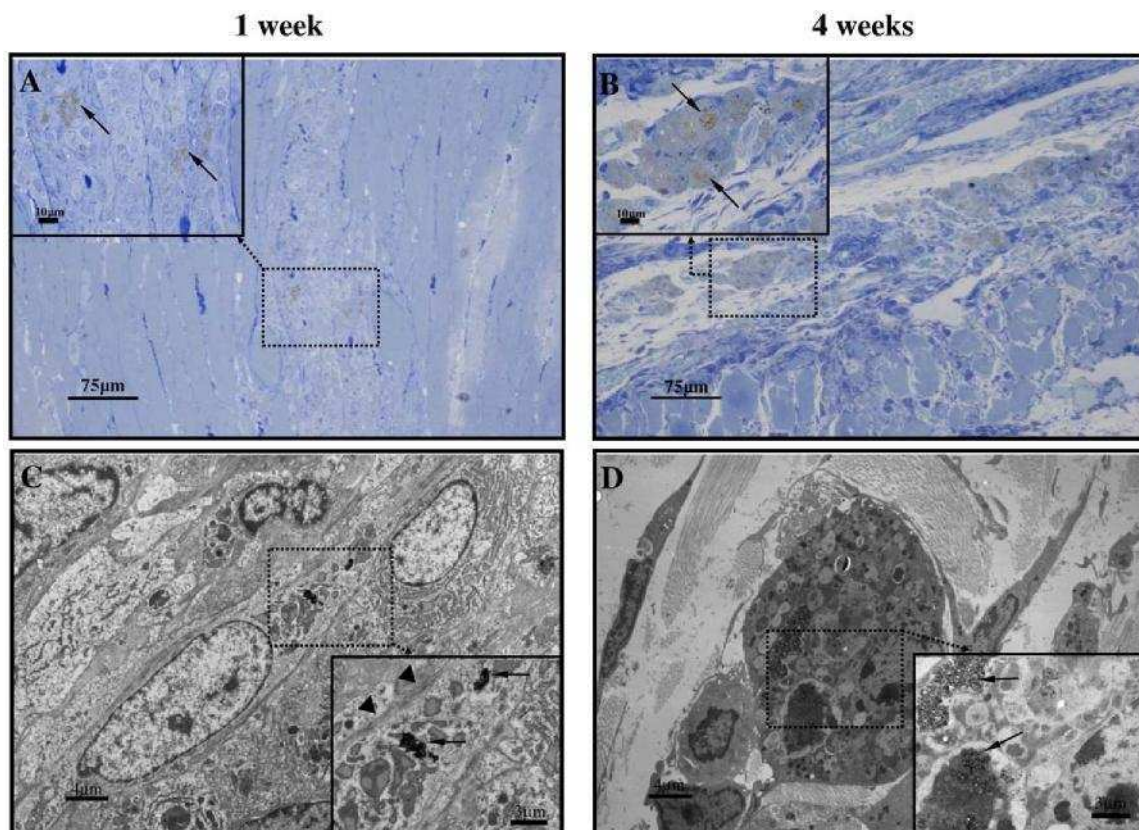


Schéma 5: Analyse ultra-structurale d'un cœur greffé avec des cellules rMAPC. (A) Coupe semi-épaisse d'un cœur une semaine après la greffe. Image en angle : Les cellules greffées sont identifiables grâce à la présence de particules de fer (flèches); (C) coupes ultra-minces de cellules marquées au fer (1 semaine après la greffe). Image en angle: particules de fer dans le lysosome (flèches) et formation de fibres dans les cellules marquées au fer (pointe de la flèche); (B) Coupe semi-épaisse d'un cœur 4 semaines après la greffe. Image en angle: identification de cellules marquées au fer (flèches) (D) Analyse ultra-structurale de cellules marquées au fer 4 semaines après la greffe. Les cellules chargées de fer correspondent à des macrophages. Image en angle: Fort agrandissement des particules de fer (flèches).

Un mois après la greffe, il n'y avait pas de différence d'angiogenèse entre les 2 groupes, avec respectivement un nombre médian de capillaires dans la zone limite de 1754 [1445;1891] et 1700 [1636; 1881] par mm² dans le groupe témoin et le groupe cœurs greffés avec des cellules rMAPC. De plus, il n'y avait pas de différence dans la densité des artérioles entre les

animaux-témoins (58,8 [36,76; 88,24]) et les animaux greffés avec des rMAPC (59,27 [38,38; 114,71]), la densité étant définie comme le nombre de vaisseaux positifs à l'actine du muscle lisse par mm².

Discussion

Cette étude a principalement permis de découvrir que sur un modèle de rat atteint d'infarctus chronique, la greffe de cellules rMAPC ne permet pas d'augmenter la FE au-delà de celle enregistrée dans le groupe des cœurs témoins ayant reçu l'injection d'un placebo, ce qui est bien corrélé avec le défaut de prise de greffe prolongée dans les cœurs ayant reçu une injection.

L'observation initiale in vitro, selon laquelle les cellules MAPC se différenciaient au niveau unique de la cellule, en cellules ayant les caractéristiques des 3 couches embryonnaires (Jiang Y. 2002), augmentait l'espoir qu'elles pourraient être utilisées à des fins thérapeutiques pour réparer des tissus dégénérés malgré les défis techniques associés à leur identification (principalement dus à des marqueurs de surface négatifs) et la complexité de leur culture. Cependant, au cours de ces essais nous n'avons pas pu détecter par immunohistochimie des cellules rMAPC marquées à la protéine GFP dans aucune des coupes cardiaques, et ce un mois après la greffe, bien que la prise de greffe des cellules ait pu être documentée au cours des 2 premières semaines qui ont suivi la greffe, en se fondant sur le marquage au fer des cellules greffées ainsi qu'à l'étiquette de la protéine GFP. Un mois après l'injection, nous n'avons pas trouvé d'ADN codant pour la protéine GFP par PCR, ce qui suggère qu'il n'y avait pas, à ce stade, de cellules rMAPC viables dans les cœurs. Conformément à ces données, nous n'avons pas retrouvé de prolifération de cellules rMAPC par coloration et marquage au proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (non publié ici). Il a été précédemment observé au

cours d'autres études, que les cellules de moelle osseuse greffées disparaissent avec le temps (Murry 2004, Agbulut 2004) peut-être le reflet de la sensibilité intrinsèque de ces cellules au manque de signaux nécessaires favorisant la survie cellulaire et/ou leur différenciation, dans ces milieux hypoxiques et fibreux. Cette supposition est confirmée par un état avancé de cicatrisation et de fibrose, compatible avec nos découvertes selon lesquelles l'apoptose, étape qui caractérise la première période post-infarctus n'était pas détectée par l'essai TUNEL (non publié ici). La présence de macrophages marqués au fer détectables immédiatement un mois après la greffe, suggère aussi une possible réponse inflammatoire due au rejet du greffon qui a pu survenir malgré l'immunosuppression par ciclosporine. En effet, des études récentes ont démontré que le manque d'expression d'antigène HLA de classe I dans les cellules MAPC est associé à un rejet, à médiation NK, lorsqu'il était greffé chez des souris NOD-SCID (Tolar 2006). Dans ces essais, le contraste qui existe entre la tendance des cœurs greffés avec des cellules rMAPC à prévenir la détérioration de la FE dans le temps et l'absence de prise de greffe prolongée suggère l'implication possible des mécanismes paracrines où les cytokines et/ou les facteurs de croissance libérés par les cellules (Kinnaird 2004) présents au tout début de période qui suit la greffe, seraient responsables d'effets cardioprotecteurs qui pourraient ensuite rester actifs même si les cellules sources ont disparu. Ces effets pourraient entraîner des changements favorables dans la composition de la matrice extracellulaire si l'on prend en compte les récentes découvertes, qui montrent que la greffe de cellules souches mésenchymateuses chez les rats atteints d'infarctus du myocarde réduit le contenu en collagène et le taux de mRNA de facteur de croissance transformant β -1 (Xu 2005). Ces modifications biochimiques de la matrice extracellulaire, associées à un possible "effet ceinture" des cellules greffées, pourraient contribuer à un mécanisme de stabilisation de la paroi ventriculaire. Les résultats de cette étude ne sont pas en faveur d'effet sur l'angiogenèse ou sur l'arteriogenèse, comme les progéniteurs endothéliaux semblent le mettre en avant

(Rehman 2003), et malgré la découverte d'un petit nombre de cellules marquées au fer et positives aux marqueurs endothéliaux à différentes périodes post-greffe. Notre expérience ne permet pas de distinguer si ce phénotype est le résultat d'une différenciation, comme il a été décrit avec les cellules MAPC d'origine humaine, ou s'il s'agit du résultat d'une fusion (Reyes 2002, Alvarez-Dolado 2003). Enfin, la mobilisation paracrine des cellules souches internes (Beltrami 2001) serait un autre mécanisme possible, mais il ne s'agit jusqu'à présent que d'une spéculation, qui n'est en fait pas confirmée par l'incapacité des cellules rMAPC greffées à améliorer la FE de manière significative. Dès lors, un possible effet secondaire de la protéine eGFP peut être exclu, car bien que la GFP puisse altérer le couplage électromécanique en bloquant les liens actine-myosine grâce aux dépôts sarcomériques de protéine fluorescente (Agbulut 2006), un tel phénomène est sans rapport avec notre expérience actuelle où aucune des cellules rMAPC greffées n'a montré une capacité de différenciation en cardiomyocytes impliquant le développement d'un appareil contractile organisé.

Limites

Premièrement, la période de suivi a été limitée à 1 mois, aucune conclusion ne peut donc être formulée concernant la pérennité des effets du traitement au-delà de cette période. Deuxièmement, nous avons utilisé un modèle d'occlusion permanente de l'artère coronaire qui peut ne pas refléter la pratique médicale courante où les patients souffrant d'un infarctus aigu du myocarde bénéficient souvent d'une reperfusion précoce du vaisseau responsable. La sensibilité des cellules rMAPC à l'hypoxie pourrait expliquer le fait qu'elles n'aient pas survécu après 2 semaines. On ne peut donc pas exclure que leur devenir aurait été différent dans un milieu revascularisé.

Troisièmement, les cellules ont été injectées 2 semaines après l'infarctus, à une période où la cicatrisation est en phase de granulation; cet environnement peut ne pas être favorable à la survie du greffon cellulaire. Il est donc possible que des injections plus précoces auraient permis aux cellules de trouver des signaux plus appropriés à leur survie et à leur différenciation.

Quatrièmement, le rejet immunitaire à médiation NK peut être responsable du peu de prise de la greffe, augmentant ainsi la possibilité d'une amélioration de la survie cellulaire par des schémas immunosuppresseurs plus appropriés. Enfin, aucun essai n'a été tenté pour dédier les cellules rMAPC à une lignée cardiaque avant de les greffer ; en effet, mêmes les cellules souches embryonnaires pluripotentes ont un taux limité de différenciation spontanée en cardiomyocytes in vitro. Il est nécessaire d'utiliser différentes combinaisons de facteurs de croissance et de conditions de culture pour les guider sur ce chemin (Kofidis 2004, Heng 2004). Il est donc probable que la prédifférenciation des cellules rMAPC vers un phénotype cardiaque soit nécessaire pour améliorer la prise de la greffe et la différenciation finale en cardiomyocytes matures. Enfin, nous ne pouvons pas exclure le fait que la petite taille de l'échantillon peut nous avoir conduits à manquer des différences significatives dans les FE post-greffe, qui approchent le seuil des 0,05.

Conclusion

Malgré ces limites, ces données actuelles nous permettent raisonnablement de conclure que le potentiel de différenciation multi-lignée démontré par les cellules MAPC in vitro ne se traduit pas par une prise de greffe cardiaque in vivo sur le long terme ni une différenciation lorsque l'on utilise des cellules rMAPC non-différenciées et greffées dans une cicatrice d'infarctus. Bien que cette découverte se double d'un manque d'amélioration significative de la FEVG,

des études complémentaires semblent justifiées pour déterminer si les modifications de traitement des cellules MAPC, leur microenvironnement local ou le moment de leur injection, pourrait optimiser l'utilisation de ces cellules et donner lieu à un possible bénéfice.

4- L'érythropoïétine peut-elle améliorer la prise de greffe des myoblastes squelettiques après un infarctus du myocarde ?

Le dernier travail effectué au sein de l'U633, en expérimentation animale, avait également pour objectif une amélioration des résultats fonctionnels de la thérapie cellulaire par myoblastes. Les résultats encourageants par l'apport du gène HIF-1 α conduisant à essayer une des protéines codées par ce gène : l'érythropoïétine.

Apport personnel pour ce travail, publié : *J Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2007 Jun;6(3):293-7.* (cf chapitre IX).

- chirurgie et anesthésie de tous les animaux opérés
- soins courants sur toute la durée du protocole
- préparation des échantillons après sacrifice des animaux
- collecte des données
- participation à l'analyse des données, rédaction finale de l'article

Collaborations et aides pour l'élaboration du projet :

- Agnès Maurel, Valérie Bellamy collaboration active pour toutes les manipulations en laboratoire
- Alain Hagège et Sylvain Chanséaume : cardiologues référents de l'étude pour les échocardiographies

- Patrick Bruneval, Chantal Mandet : préparation des lames et analyse histologique
- Professeur Philippe Menasché : directeur du travail et véritable référent, du début jusqu'à la finition complète. Aide et soutien intellectuel, financier, logistique, psychologique et rédactionnel

« L'érythropoïétine peut-elle améliorer la prise de greffe des myoblastes squelettiques après un infarctus du myocarde ? »

Introduction

Malgré les données encourageantes faisant la “preuve du concept” et suggérant que les myoblastes squelettiques greffés peuvent améliorer les fonctions du ventricule gauche (VG) après un infarctus du myocarde, l'efficacité de la procédure reste limitée par le taux élevé de perte cellulaire (Maurel 2005), conséquence à la fois du mécanisme de fuite lors des injections et de la mort cellulaire du greffon. Puisque la mauvaise vascularisation des tissus cicatriciels cibles et l'ischémie du greffon qui en découle sont des facteurs contributifs à cette mort cellulaire, plusieurs stratégies ont été développées pour augmenter la vascularisation de la zone d'injection, en se basant principalement sur les facteurs de croissance (Yau 2004) (Azarnoush 2005). Cette étude a été conçue dans le but d'évaluer les effets de l'érythropoïétine (EPO) en partant du principe que cette cytokine anti-apoptotique et angiogénique (Maiese 2005) pouvait augmenter le taux de survie des myoblastes squelettiques et les résultats fonctionnels associés.

Méthodes

Notre expérience a été réalisée conformément aux ‘Principles of Laboratory Animal Care’ (principes des soins à apporter aux animaux de laboratoire) rédigés par la National Society for Medical Research (Société nationale pour la recherche médicale) et le “Guide pour les Soins et l’Utilisation des Animaux de Laboratoire” préparé par l’Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, et publié par National Academy Press, révision de 1996.

Cultures cellulaires

Les cultures initiales de cellules musculaires ont été préparées à partir de rats mâles Lewis nouveau-nés (Charles Rivers, Arbresle, France) selon un protocole défini précédemment (Azarnoush 2005). Le jour de la greffe, les cellules ont été décongelées et lavées trois fois dans un milieu modifié Eagle avec de l’albumine de sérum bovin à 0,5% (fraction V ; Sigma, St Louis, MO).

Erythropoïétine

L’injection en intra péritonéal de la rhEPO (Epoetine Alfa 10000 UymL [Eprex ®], Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) a débuté le jour précédent la greffe de cellules. Elle a été administrée à une dose de 500 U/kg trois fois par semaine pendant deux semaines.

Modélisation de l’infarctus du myocarde

Des rats femelles Lewis (Charles Rivers) ont été anesthésiées par isoflurane (1–3%). L’accès au cœur a été réalisé par une thoracotomie gauche et la ligature de l’artère coronaire gauche à

l'aide d'un point de polypropylène 5/0 (Ethicon, Somerville, NJ) a permis de générer un infarctus du myocarde.

Protocole expérimental

Treize jours après la création de l'infarctus, une échocardiographie initiale a été pratiquée sur les rats pour évaluer la fonction du ventricule gauche (VG) ; seuls ceux dont la fraction d'éjection (FE) était inférieure à 45% ont été sélectionnés pour ces essais. Après la réalisation d'une sternotomie médiane, ces animaux ont été répartis au hasard pour recevoir des injections intra-myocardiques du milieu de culture (témoins, n=7), de myoblastes squelettiques (5×10^6 , n=10), d'EPO (n=8), ou de myoblastes squelettiques (5×10^6) combinés avec de l'EPO (n=10). Lors de chaque injection, 150 µl volume étaient injectés à l'aide d'une aiguille de 19 gauge en trois ou quatre sites au centre et en bordure de la cicatrice d'infarctus. Aucun traitement immunosuppresseur n'a été administré de part la nature syngénique de ces animaux de laboratoire

Critères cliniques :

Hématocrite

Le taux d'hématocrite a été analysé le jour de l'infarctus et le jour du sacrifice.

Fonction ventriculaire gauche

La fonction ventriculaire gauche a été mesurée par échocardiographie en 2D (Agilent SONOS HP-5500 avec une sonde de 7,5 MHz) peu de temps avant les injections (c.à.d. 13 jours après l'infarctus) et un mois après, comme décrit précédemment (Azarnoush 2005).

Prise de greffe des cellules et angiogénèse

Après le dernier examen échocardiographique, les cœurs ont été prélevés et séparés en deux moitiés par une coupe petit axe passant par la partie centrale de la zone de nécrose. Les analyses histologiques et immunohistochimiques ont été pratiquées à partir des deux blocs de chaque cœur sur des coupes cryostat de 8 mm d'épaisseur. La vascularisation et la prise de greffe des myoblastes ont été mesurées par immunomarquage, à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-cellules endothéliales de rat (RECA, clone HIS52, Serotec, Oxford, UK) et de myosine squelettique rapide (clone My-32, Sigma, St Louis, MI), les deux étant conjugués à un anticorps secondaire anti IgG de souris biotinylé (Vector, Burlingame, CA). Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un microscope (Leica DMIL, Wetzlar, Germany) équipé d'une caméra digitale (Qicam, Qimaging, Burnaby, BC, Canada). Les images digitales ont été obtenues à partir d'un grossissement moyen de dix (respectivement X10 et X5 pour l'agrandissement objectif de l'angiogénèse et la prise de greffe des cellules); elles ont ensuite été traitées par le logiciel Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA).

Survie cellulaire

Les ventricules gauches d'un sous-groupe comprenant la greffe de myoblastes mâles chez des femelles, excisés à la fin de l'étude (n=3 pour les groupes myoblastes uniquement et myoblastes + EPO), ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C. Les muscles ont été décongelés sur la glace, hachés et digérés jusqu'à obtenir une homogénéité dans la nuit à une température de 4 °C dans un tampon de lyse (Roche, Basel, Suisse). L'acide désoxyribonucléique (ADN) a été isolé à partir de tous les homogénéisats grâce au kit de purification d'ADN Wizard (Promega, Charbonnières, France), dissout dans un tampon de Tris-HCl (5 mmol/ l, pH 8,5) et analysé en temps réel par PCR quantitative décrite précédemment (Ott 2004). Une séquence spécifique du chromosome Y du rat située dans la zone du Y déterminant le sexe (sry) a été utilisée pour déterminer les quantités relatives de cellules masculines après greffe.

Apoptose

La technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling) a permis de visualiser in situ la fragmentation nucléaire de l'acide désoxyribonucléique, à l'aide du dispositif DeadEnd™ Fluorometric TUNEL (Promega).

Analyse des données :

Toutes les analyses fonctionnelles et histologiques ont été réalisées en aveugle. L'analyse de la variance (ANOVA) pour les groupes, la période et leur interaction ont été utilisées pour établir les comparaisons entre les groupes et au sein des groupes, des taux d'hématocrite et de la fonction ventriculaire gauche. Lorsque le test global Fisher était significatif, le test de Student a permis d'établir des comparaisons appariées. Le seuil critique α a été défini à 0,05 et la procédure descendante de Bonferroni-Holm a été utilisée pour ajuster les multiples

comparaisons. Les données sont affichées comme la moyenne $\pm$ la déviation standard (D.S) ou comme une estimation des différences avec leur intervalle de confiance associé (IC 95%). Les différences entre les moyennes de la FE sont exprimées comme points pourcentage. Toutes les analyses ont été faites grâce au logiciel SAS Statistical (Version 8.2, Cary, NC, USA).

Résultats

Mortalité des animaux

Le taux de mortalité précoce après la ligature de l'artère coronaire et la greffe était respectivement de 11% et 5%, sans différence entre les différents groupes.

Caractérisation des cellules injectées

Lors de la greffe, le pourcentage de cellules myogéniques, était de 54,6% comme le montre les tests positifs à la desmine. L'exclusion au bleu trypan a permis de déterminer que le taux de viabilité post-décongélation était de 85%.

Modifications du taux d'hématocrite

Initialement, les taux d'hématocrite étaient en moyenne respectivement de $42\pm 2\%$, $41\pm 3\%$, $42\pm 4\%$, et $41\pm 3\%$ dans les groupes témoin, EPO, myoblastes uniquement et myoblastes + EPO (effet principal simple du groupe initial : $P=0,90$). A un mois, les taux d'hématocrite restaient inchangés par rapport aux valeurs initiales dans les groupes témoin et myoblastes uniquement (respectivement $41\pm 2\%$ et $41\pm 3\%$), alors qu'ils avaient augmenté de manière significative dans le groupe de rats traités par EPO uniquement ($52\pm 5\%$) ou dans le groupe EPO + myoblastes ($50\pm 5\%$). En ce qui concerne ces deux groupes, la différence avec leurs

congénères non-traités était très significative (les différences estimées à un mois allaient de 8,3 et 11,5% points, $P < 0,0001$ pour chaque comparaison appariée).

Résultats fonctionnels

Les FE initiales allaient de 33 à 38% et n'étaient pas significativement différentes d'un groupe à un autre (effet principal simple du groupe initial : $P = 0,34$). Par contre, le schéma des modifications était par la suite très différent entre les groupes (schéma 1). Ainsi, après 1 mois, la FE des deux groupes ayant reçu une greffe de myoblastes était très nettement supérieure à celle du groupe témoin avec ou sans EPO (11,4 [IC 95% : 3,7 ; 19,1]% points, $P = 0,02$) ou (11 [IC 95% : 2,9 ; 19,1]% points, $P = 0,03$). Les différences entre les deux groupes ayant reçu une greffe de myoblastes et le groupe EPO uniquement suivaient le même schéma (14,9 [IC 95% : 7,1 ; 22,8]% points pour les myoblastes uniquement vs. EPO, $P = 0,02$ et 15,3 [IC 95% : 7,9 ; 22,8]% points pour les myoblastes + EPO vs. EPO, $P = 0,001$). Cependant, l'ajout d'EPO au sein des deux groupes traités par myoblastes n'a pas permis d'augmenter la FE de manière significative à une valeur supérieure à celle des cœurs n'ayant reçu que des myoblastes (différence entre les groupes : 0,4 [IC 95% : -7,0 ; 7,9]% points, $P = 0,91$). Des augmentations significatives du LVEDV et du LVESV (respectivement $P = 0,0003$ et $P = 0,0011$, vs. valeurs initiales) ont été enregistrées sur tous les cœurs et bien que ceux ayant reçu une injection de myoblastes, avec ou sans EPO, ont montré une plus faible augmentation du LVESV que les cœurs n'ayant pas reçu d'injection cellulaire (Tableau 1), les différences à un mois entre les groupes n'étaient pas significatives.

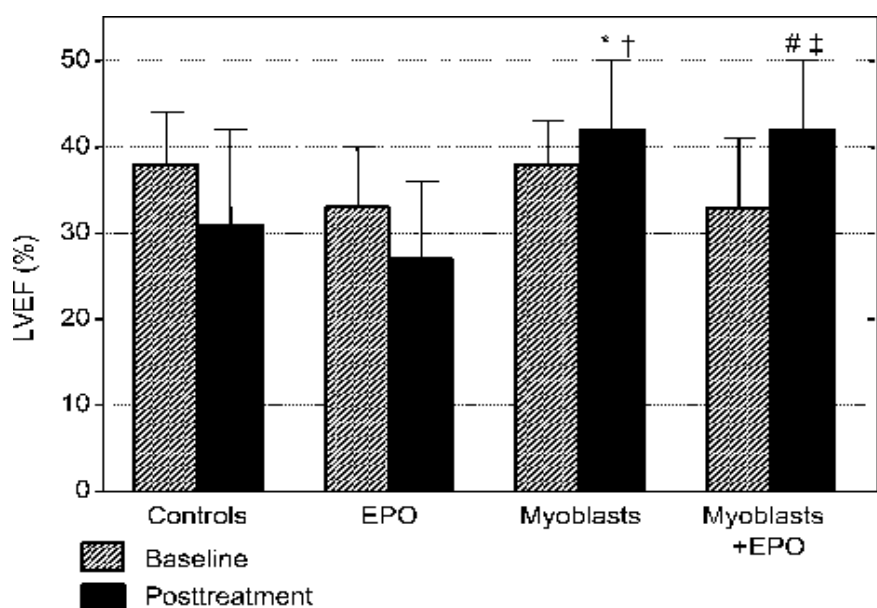


Schéma 1. Modifications de la fraction d'éjection du ventricule gauche *P=0,03 vs. témoin; †P=0,02 vs. EPO uniquement ; # P=0,02 vs. témoin; ‡P=0,001 vs. EPO uniquement ; FEVG, fraction d'éjection du ventricule gauche. Les données sont des moyennes $\pm$ D.S

Paramètres	Témoins <i>n</i> =7	EPO <i>n</i> =8	Myoblastes <i>n</i> =10	Myoblastes + EPO <i>n</i> =10
LVEDV				
Valeurs initiales	0,40 $\pm$ 0,07	0,42 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,09
Post traitement	0,46 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,17	0,47 $\pm$ 0,13	0,52 $\pm$ 0,09
% modification	18,2 $\pm$ 25,1	30,1 $\pm$ 30,8	17,6 $\pm$ 25,0	33,4 $\pm$ 51,8
LVESV				
Valeurs initiales	0,25 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,08
Post traitement	0,31 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,18	0,28 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,07
% modification	30,9 $\pm$ 27,0	43,1 $\pm$ 39,1	9,9 $\pm$ 27,8	13,4 $\pm$ 41,2

Tableau 1: Modifications des volumes de fin de diastole et de fin de systole du ventricule gauche (respectivement LVEDV et LVESV). Les données (ml) sont données comme des moyennes $\pm$ D.S. EPO, érythropoïétine.

Prise de greffe des cellules, angiogenèse et survie

Le nombre de vaisseaux positifs au gène recA retrouvés dans la zone de l'infarctus des rats ayant reçu une greffe de myoblastes n'était pas modifié par l'EPO : respectivement $1,191 \pm 147 / \text{mm}^2$ et $1,086 \pm 228 / \text{mm}^2$ dans le groupe myoblastes uniquement et dans le groupe myoblastes + EPO. L'EPO n'a pas non plus permis d'augmenter l'angiogenèse dans le myocarde sain à distance de la zone nécrotique ($2,120 \pm 39 / \text{mm}^2$ vs. $2,359 \pm 386 \text{ mm}^2$ dans le groupe myoblastes uniquement). La greffe de myoblastes était similaire à ces modèles puisque la zone My32 positive à la fluorescence (exprimée comme pourcentage de la zone d'infarctus) ne montrait pas de différence avec les cœurs ayant reçu uniquement des myoblastes ($7,1 \pm 1,5\%$) et ceux où l'injection de myoblastes était associée à de l'EPO ($11,2 \pm 6,9\%$). Les coupes représentatives sont montrées dans le schéma 2. Conformément à ces données, le nombre de cellules donatrices estimé par l'ACP concernant le chromosome sry était similaire dans ces deux groupes et était en moyenne de 1×10^6 .

Apoptose

Un mois après la greffe, l'apoptose était presque négligeable puisque très peu de cellules contenant des noyaux positifs au TUNEL ont pu être détectées sur les coupes de cœurs, que l'EPO ait été ou non combinée avec les myoblastes.

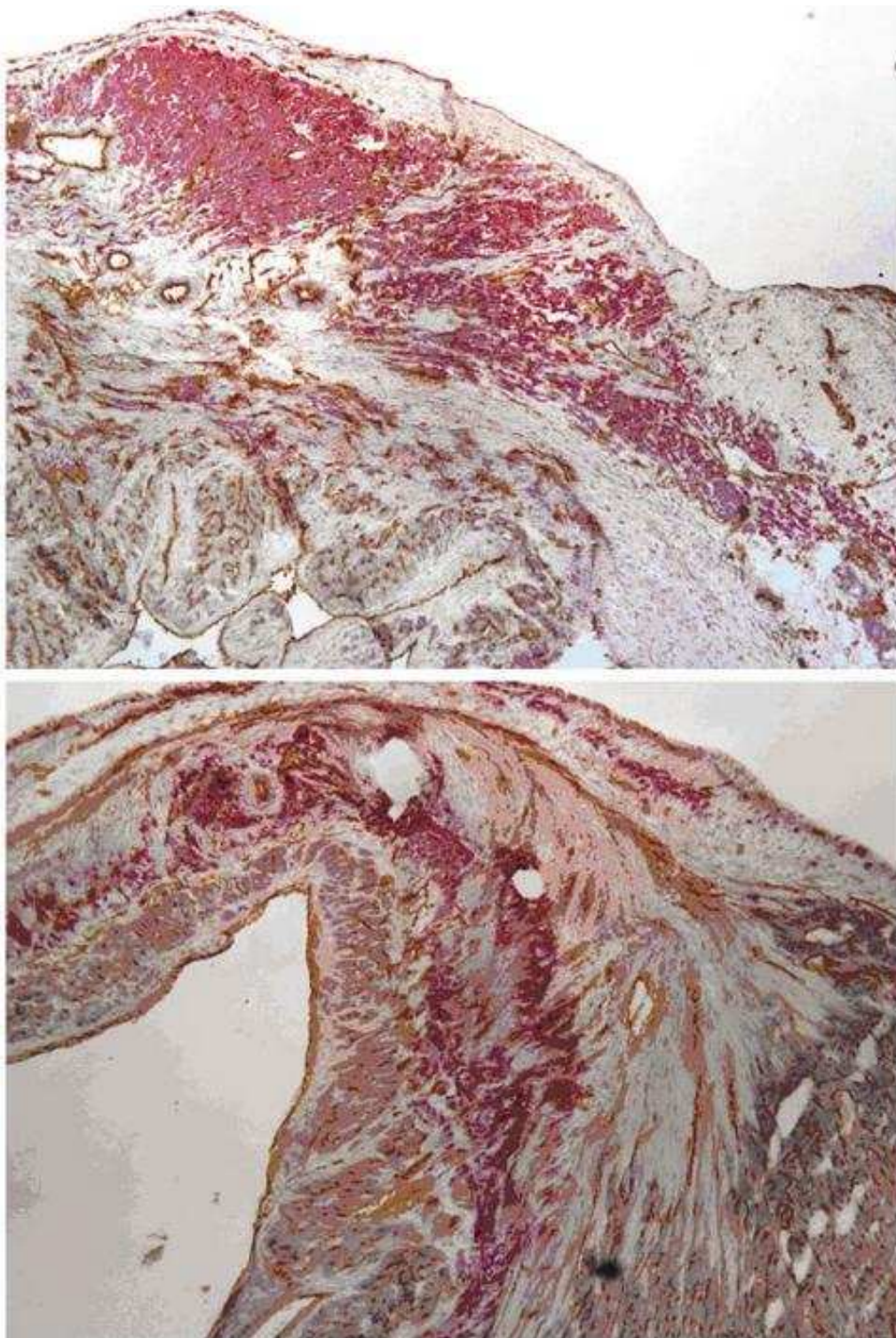


Fig. 2. Greffe de myoblastes dans un cœur n'ayant reçu que des myoblastes (image du haut) et dans un cœur ayant reçu des myoblastes + EPO (image du bas). Grossissement X 5

Discussion

Cette étude confirme les bénéfices de la greffe de myoblastes squelettiques mais elle n'a pas permis de démontrer que l'adjonction d'un traitement à l'EPO améliorerait la survie cellulaire, l'angiogenèse et les résultats fonctionnels.

Arguments pour l'utilisation de l' EPO

Les causes principales de mort cellulaire post-greffe incluent principalement l'inflammation, la perte des signaux de survie de la matrice extracellulaire et l'ischémie du greffon. Afin de répondre à cette composante ischémique, les interventions (autres que par la revascularisation directe par angioplastie ou pontage) peuvent être classées en co-injections de facteurs de croissance angiogéniques (Azarnoush 2005), de transfection cellulaire avec certains de ces facteurs (Yau 2004) ou de co-greffe de cellules angiogéniques dérivées de la moelle osseuse (Ott 2004). Ces stratégies ont montré leur part de réussite dans l'augmentation de la néo-revascularisation locale et de la fonction ventriculaire post-infarctus, mais leur application clinique peut présenter un problème de par la courte demi-vie des protéines recombinées, la question concernant l'innocuité des vecteurs viraux ou la complexité de la greffe de cellules recombinées. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle l'administration d'EPO pourrait être une alternative efficace.

Il a été démontré que l'EPO améliorerait la fonction du VG chez un modèle animal atteint d'infarctus du myocarde (Calvillo 2003, Moon 2003) indépendamment de ses effets sur l'érythropoïèse, grâce à ces effets angiogéniques (Maiese 2005, Van der Meer 2005) et anti-apoptotiques (Calvillo 2003, Moon 2003). Dans un contexte clinique, l'EPO est attrayante car son profil de sécurité est bien connu, y compris chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque (Alghamdi 2006). La découverte de récepteurs EPO sur des cardiomyocytes

ventriculaires et cellules endothéliales humaines (Depping 2005) étaie la thèse selon laquelle cette solution pourrait être un complément utile à la greffe cellulaire chez des patients atteints d'une pathologie cardiaque ischémique.

Interprétation des données

L'incapacité de l'EPO à potentialiser les bénéfices fonctionnels de la greffe de myoblastes n'est certainement pas la conséquence d'une administration inefficace de la solution puisque les taux d'hématocrite sont significativement plus élevés dans les groupes traités par EPO.

Cette découverte négative peut sembler surprenante car, sauf pour une étude (Hale 2005), les comptes-rendus antérieurs sur l'EPO rapportaient sa capacité à réduire la taille de l'infarctus, à remodeler le VG et les troubles fonctionnels de contractilité chez le modèle du rat et du chien lors d'occlusion-reperfusion (Calvillo 2003) ou lors de ligature permanente de l'artère coronaire (Moon 2003, Parsa 2003). Cependant, cette discordance pourrait s'expliquer par les différences essentielles entre les temps de traitement et les critères cliniques principaux. Au cours de toutes ces études positives, sauf une (Van der Meer 2005), l'administration d'EPO a débuté au moment de l'infarctus (Parsa 2003) ou au début de la reperfusion (Calvillo 2003) (Parsa 2003) avec pour objectif principal de réduire la taille de l'infarctus. A l'inverse, dans notre étude, l'administration de la solution a été retardée jusqu'à trois semaines après l'infarctus et avait pour principal objectif d'améliorer la vascularisation du greffon et sa survie. Au cours de cette étape tardive, la cicatrisation de l'infarctus est déjà largement terminée et les signaux requis pour garantir l'efficacité de l'EPO peuvent s'être estompés. Plus spécifiquement, l'apoptose des cardiomyocytes natifs n'est plus un phénomène prédominant, il manque donc une cible importante aux effets de l'EPO. De même, si la mobilisation des cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse assure la médiation des propriétés angiogéniques de l'EPO (Heeschen 2003), la voie d'accès nécessaire à la bonne

régénération du myocarde peut aussi être perturbée car le SDF-1 n'est plus régulé aussitôt après infarctus. Cette hypothèse est étayée par les études dose-réponse montrant une fenêtre thérapeutique relativement étroite (Moon 2005).

Limites

Les limites de l'étude sont les échantillons de petites tailles, les examens échocardiographiques opérateur-dépendant, le suivi court et l'absence de relation dose-réponse. En effet, bien que l'absence d'une évaluation directe des concentrations myocardiques en EPO ne permette pas d'éliminer un problème de dosage, le protocole médicamenteux a été choisi afin de correspondre à un protocole clinique approprié et réellement efficace en matière d'augmentation significative des taux d'hématocrite. La voie d'administration systémique (intra péritonéale) plus que la dose, pourrait expliquer l'efficacité thérapeutique sous-optimale puisque notre modèle d'occlusion permanent de l'artère coronaire peut avoir empêché l'administration efficace de la solution dans les zones ciblées du myocarde. Cette hypothèse est confortée par la récente découverte de fonctions améliorées et d'une réduction de la fibrose chez un modèle porcin atteint d'une ischémie chronique progressive du myocarde chez qui l'EPO avait directement été injectée dans la zone ischémique par injections endocardiques (Krause 2006).

En conclusion, les résultats actuels montrent qu'un protocole cliniquement approprié d'administration d'EPO dans le contexte d'un infarctus du myocarde non reperfusé n'a pas permis d'améliorer la prise de greffe des myoblastes et les fonctions du VG post- greffe ce qui justifie ainsi la recherche en cours de stratégies plus efficaces permettant d'améliorer la survie cellulaire.

V- Applications en recherche humaine :

Dépôt d'un PHRC en 2007. Protocole accepté et actuellement en cours sur le CHU G. Montpied

Ces projets de recherche en laboratoire aboutissent à l'écriture, soumission et acceptation d'un protocole de recherche clinique sur l'homme.

Le rationnel du projet s'appuie sur deux constatations. Premièrement, la chirurgie de pontage aorto coronaire bien que très efficace dans le traitement de l'ischémie myocardique n'est pas capable d'améliorer la contractilité myocardique chez des patients avec un remodelage avancé du VG, et ceci malgré la persistance d'une viabilité résiduelle importante. Or, l'absence d'amélioration de la fraction d'éjection se manifeste par l'absence d'amélioration de signes d'insuffisance cardiaque et un mauvais pronostic à moyen terme. D'autre part, il a été récemment démontré que l'injection intramyocardique des cellules souches dans les territoires hibernants chez les patients non revascularisables permet d'améliorer la contractilité globale du VG et cela malgré une dilatation importante de la cavité. Il est donc intéressant d'évaluer l'association de la revascularisation chirurgicale et de la greffe cellulaire dans la prise en charge des patients qui présentent une dilatation importante du VG mais une viabilité résiduelle.

Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est de vérifier l'hypothèse que l'association de la chirurgie de revascularisation coronaire et d'une greffe intra-musculaire de cellules mononuclées médullaires permet une amélioration de la fonction contractile globale du VG des patients ayant une cardiopathie ischémique évoluée (définie comme une augmentation du volume télé

systolique > 130 ml et une fraction d'éjection < 40%) et une viabilité résiduelle importante (définie comme > 30% du VG).

Type d'étude

Il s'agit d'une étude pilote, monocentrique, en groupes parallèles, prospective, contrôlée, randomisée et en simple insu. Nombre de sujets inclus : 30 (15 par groupe).

Méthodologie

Deux groupes seront donc comparés dans cette étude :

- **Groupe A** : patients traités exclusivement par la chirurgie de revascularisation coronaire
- **Groupe B** : patients traités par l'association de la greffe de cellules souches médullaires autologues à la chirurgie de revascularisation.

L'amélioration de la fonction contractile globale sera appréciée en mesurant la fraction d'éjection globale du VG. Une augmentation d'au moins 5 % de cette dernière entre la période préopératoire et le contrôle à 6 mois sera considérée comme un succès. (La comparaison entre la période préopératoire et 1 an sera également réalisée).

Le prélèvement de la moelle osseuse par ponction au niveau du sternum ou des crêtes iliaques sera réalisé le jour de l'intervention. Le prélèvement sera transféré dans le centre de thérapie cellulaire où des cellules mononuclées seront préparées pour l'injection. Cette préparation cellulaire sera renvoyée immédiatement au bloc opératoire où la greffe cellulaire sera réalisée dans les territoires repérés hibernants avant l'intervention.

Les patients présélectionnés, qui accepteront la participation dans l'étude bénéficieront d'une imagerie par résonance magnétique et d'une imagerie isotopique (TEP au 18 FDG et TEMP au Tc99m-sestamibi) pour confirmer leur éligibilité dans l'étude. Avant la réalisation du geste

opératoire, tous les patients bénéficieront d'une évaluation clinique et biologique complète ainsi que d'une épreuve d'effort métabolique.

Le suivi clinique sera réalisé à la sortie de l'hôpital, à un mois, à 6 mois, à 1 an et à 2 ans. Le suivi biologique sera réalisé dans la période post-opératoire immédiate (en ce qui concerne les paramètres d'inflammation ou de souffrance myocardique) et à 1 mois, 6 mois, 1 an et à 2 ans (en ce qui concerne le dosage de BNP). Au 6ème mois et à 1 an tous les patients bénéficieront d'un autre examen par l'IRM (pour évaluer l'évolution des volumes ventriculaires, la fraction d'éjection globale et la contractilité régionale) et d'un TDM (à la recherche d'un éventuel dysfonctionnement des pontages) et d'une épreuve d'effort métabolique (pour apprécier l'amélioration de l'état clinique).

Apport personnel pour ce travail :

- participation à la rédaction du protocole
- intervention chirurgicale pour tous les patients participant à l'étude
- coordination des différentes équipes
- collecte des données avec l'aide de l'attaché à la recherche clinique

Collaborations et aides pour l'élaboration du projet :

- Janusz Lipiecki : cardiologue référent de l'étude et participation active à la rédaction du protocole avant sa soumission
- Justyna Kanold : responsable pour le prélèvement, la purification et la préparation du greffon cellulaire (centre régional de cancérologie et thérapie cellulaire pédiatrique)
- P. Chabrot, F. Cachin : responsables de l'imagerie
- D. Morand : Attaché de recherche clinique

PHRC LOCAL :

« Analyse de l'efficacité de l'association d'une revascularisation coronaire chirurgicale à l'injection de cellules mononuclées médullaires autologues dans le traitement de patients atteints d'une myocardiopathie ischémique avec une viabilité résiduelle »

Code Promoteur : PHRC R 2005 DE RIBEROLLES

N°IDRCB : 2007-A00087-46

➤ Promoteur

C.H.U. de Clermont-Ferrand
58 rue Montalembert
BP 69
63003 Clermont-Ferrand cedex 1

➤ Investigateur principal

Professeur Charles De Riberolles
Service de Chirurgie Cardiovasculaire
BP 69
63003 Clermont-Ferrand cedex 1
Tél : 04 73 751 578
Fax : 04 73 751 568
cderiberolles@chu-clermontferrand.fr

Rationnel de l'étude

Le pronostic des patients atteints d'une cardiopathie ischémique au stade d'insuffisance cardiaque congestive reste mauvais malgré des progrès thérapeutiques récents (Gheorghiadu 1998, Baker 1994). La mortalité annuelle des patients atteints d'une insuffisance cardiaque sévère (classe IV de la NYHA) atteint 20% malgré un traitement optimal associant un

inhibiteur d'enzyme de conversion et un bêta-bloquant de la troisième génération (Packer 2001). La prévalence de l'insuffisance cardiaque augmente dans des pays occidentaux, dont en France, devenant une véritable endémie du XXIème siècle (Zannad 1999). Le coût de la prise en charge de cette pathologie croît proportionnellement à sa prévalence; selon l'INSERM, en 1992, le coût total de l'insuffisance cardiaque en France était de 700 millions euros, dont 530 millions pour les hospitalisations.

La transplantation cardiaque reste une option thérapeutique très valable pour des patients atteints d'une insuffisance cardiaque terminale, mais la pénurie de greffon ainsi que les problèmes d'un traitement anti-rejet au long cours en limitent l'utilisation.

La resynchronisation de la contractilité par une stimulation bi-ventriculaire permet d'améliorer de façon parfois spectaculaire l'état des patients atteints d'asynchronisme (Abraham 2002), mais ils ne représentent qu'une minorité des patients en insuffisance cardiaque (McAlister 2006).

La revascularisation chirurgicale par pontage aorto-coronaire reste une méthode thérapeutique de référence des patients porteurs d'une cardiopathie ischémique multitrunculaire, même en présence d'une altération importante de la fonction contractile (Cimochowski 1997, Trachiotis 1998). La décision d'une revascularisation chez des patients présentant une altération de la contractilité (fraction d'éjection < 35%) et des signes d'insuffisance cardiaque est souvent prise en fonction de l'existence d'une viabilité résiduelle. Il a été démontré qu'en absence de viabilité dans des territoires akinétiques, il n'y a pas de bénéfice clinique à moyen terme avec un risque opératoire important (Lee 1994). Une amélioration de la contractilité globale (appréciée par la fraction d'éjection) peut être espérée si la quantité des territoires viables est au moins de 25%-30% de la masse musculaire totale du VG (Tilisch 1986, Bax 1999, Schinkel 2001).

L'amélioration de la fraction d'éjection globale du VG de 5% semble être corrélée à une amélioration du pronostic (Bax 2001). Malheureusement, 30 à 40 % des patients avec une viabilité résiduelle importante n'améliorent pas la fraction d'éjection après une revascularisation et cette absence d'amélioration de la contractilité est liée à un pronostic défavorable au moyen terme. Un remodelage important du VG avec une dilatation du volume télé systolique supérieure à 50 – 60 ml/m² a été mis en évidence comme facteur le plus important de cet échec thérapeutique (Yamaguchi 1998, Schinkel 2004, Bax 2004).

Récemment, il a été mis en évidence que des cellules souches adultes présentaient une plasticité permettant d'envisager leur utilisation dans des maladies dégénératives des différents organes.

Plusieurs travaux aussi bien expérimentaux que cliniques ont été réalisés avec la greffe de cellules souches en cardiologie. Plusieurs types de cellules (cellules souches médullaires, cellules souches circulantes, cellules satellites des muscles striés) ont été évalués aussi bien dans le traitement préventif du remodelage ventriculaire gauche en post-infarctus que dans le traitement curatif chez des patients avec une cardiopathie ischémique chronique (Menasché 2001, Menasché 2003, Smits 2005, Siminiak 2004, Siminiak 2005, Strauer 2002, Wollert 2004, Schächinger 2004, Perin 2003). Dans cette deuxième population de patients, les cellules satellites des muscles striés ou les myoblastes ont été injectés dans des zones nécrosées soit pendant une chirurgie de pontage par voie épicardique (Menasché 2001, Menasché 2003, Siminiak 2004) soit par voie endo-cavitaire (Smits 2003) soit par voie trans vasculaire à partir du système veineux coronaire (Siminiak 2005).

L'amélioration de la contractilité est souvent modérée sans modification des volumes ventriculaires. Dans le travail de Perin (Perin 2003) chez des patients présentant une cardiopathie ischémique évoluée non revascularisable, ni par l'angioplastie, ni par la chirurgie, les cellules souches médullaires ont été injectées par voie endo-cavitaire par le système

NOGA dans les zones viables. Une amélioration moyenne de la fraction d'éjection de 9% (de $20\pm 9\%$ à $29\pm 13\%$) a été observée et cela malgré une dilatation importante du volume télé systolique (174.1 ± 78.7 ml) avant la procédure. Il est d'ailleurs à noter une diminution de ce volume à 133.5 ± 54 ml au contrôle au 4ème mois.

Le mécanisme d'action des cellules souches transplantées dans le tissu myocardique n'est pas clairement élucidé. Probablement, le mécanisme est complexe incluant la stimulation de la néo angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose, et peut-être une transdifférenciation des cellules souches en cardiomyocytes (Dawn 2005). Les cellules souches sont également la source de plusieurs cytokines qui peuvent avoir un effet sur la récupération fonctionnelle (Dimmeler 2005).

La question de l'innocuité de la thérapie cellulaire a été analysée dans plusieurs études. Une augmentation de taux de resténose coronaire a été signalée après l'injection intra coronaire de cellules souches CD 133+ (Mansour 2006), ou la mobilisation des cellules souches par le G-CSF (Kang 2004). Un risque de développement des troubles du rythme ventriculaire a été suggéré récemment par Hendrikx (Hendrikx 2006).

Le justificatif de notre étude est basé sur les trois notions suivantes :

- 1) 40% à 50% des patients avec une cardiopathie ischémique chronique évoluée au stade d'altération importante de la fonction systolique du ventricule gauche associée à une dilatation de la cavité, présentent une viabilité résiduelle concernant au moins 30% du muscle du VG (Tilisch 1986, Bax 1999, Schinkel 2001).
- 2) Il existe un seuil de dilatation du volume télésystolique du ventricule gauche au-delà duquel on n'observe plus de récupération fonctionnelle malgré une revascularisation chirurgicale complète et la présence d'une viabilité > 30% du myocarde (Yamaguchi 1998, Schinkel 2004, Bax 2004).

3) L'injection intramyocardique des cellules souches dans cette population de patients peut améliorer la contractilité globale (FE) et provoquer un remodelage inverse (réduction des volumes ventriculaires) (Perin 2003).

A notre connaissance les seules études qui ont analysées la faisabilité de l'injection des cellules souches dans la population de patients ayant une cardiopathie ischémique associée à une dilatation importante du ventricule gauche, en présence d'une viabilité résiduelle importante, sont celle de Perin (Perin 2003)) et celle de Patel (Patel 2005). Il est vrai que dans la seconde étude une sous-population de cellules souches (CD34+) a été testée et que les résultats ne peuvent être comparés à ceux de notre travail.

D'autres travaux ont été consacrés à l'analyse des effets de la transplantation des cellules souches chez les patients avec cardiopathie ischémique. Deux approches ont été testées ; des injections transépicaudiques lors d'une chirurgie de revascularisation et des injections transendocardiques avec un système de guidage électromagnétique. Il est à noter que les populations des patients inclus dans ces études sont différentes de celle que nous voulons étudier. Dans l'étude de Mocini (Mocini 2006) et celle de Hendrix (Hendrikx 2006), les patients ont été sélectionnés sur la base de présence d'une cicatrice d'infarctus et non sur la présence de viabilité. Dans l'étude de Hendrix, on n'a pas observé ni d'amélioration de la fraction d'éjection globale ni la réduction des volumes ventriculaires. Par contre une amélioration significative de l'épaississement régional dans le groupe traité par l'injection des cellules souches a été observée. Dans l'étude de Mocini, des injections de cellules souches ont été réalisées dans les zones bordantes de l'infarctus donc avec probablement une viabilité résiduelle au moins partielle. Dans cette étude, une amélioration de la fraction d'éjection a été observée (de 46% à 51%, $p=0.048$) et non dans le groupe témoin (de 48% à 49%, $p=NS$).

La voie d'injection transendocardique des cellules souches a été étudiée par Fuchs (Fuchs 2001, Fuchs 2003, Fuchs 2006) et par Tse (Tse 2003). Dans un travail pré-clinique, Fuchs (Fuchs 2001) a évalué in vitro la sécrétion par des cellules souches des facteurs promoteurs du développement de la circulation collatérale (VEGF et MCP-1) et également l'effet des injections de cellules souches sur un modèle du myocarde hibernant chez le cochon. Dans cette étude, il a été démontré que la production des facteurs VEGF et MCP-1 dans la culture des cellules souches augmentait avec le temps jusqu'à 4 semaines. Dans le modèle animal, une amélioration de la circulation collatérale et une augmentation de la contractilité ont été observées.

Deux autres études du même groupe ont testé l'efficacité des injections des cellules souches chez des patients avec une ischémie sévère (et donc une viabilité résiduelle) et non revascularisable par la chirurgie ou angioplastie (Fuchs 2003, Fuchs 2006). Il s'agit néanmoins d'une population de patients avec un degré bien moindre d'altération de la contractilité du ventricule gauche que les sujets éligibles dans notre étude (FE = 48%). C'est peut-être une des raisons expliquant pourquoi l'amélioration des symptômes cliniques et la diminution de l'ischémie myocardique observées, ne sont pas associées à une amélioration de la fraction d'éjection. Les mêmes remarques peuvent être adressées à l'étude publiée par Tse ((Tse 2003) ou la diminution de l'ischémie et non l'amélioration de la contractilité a été analysée dans une population de 8 patients avec une fraction d'éjection subnormale (FE = 57.6+/-10.8%).

Objectifs de l'étude

- Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est de vérifier l'hypothèse que l'association de la chirurgie de revascularisation coronaire et d'une greffe intra-musculaire de cellules mononuclées médullaires permet une amélioration de la fonction contractile globale du VG des patients ayant une cardiopathie ischémique évoluée (définie comme une augmentation du volume télé systolique > 130 ml et une fraction d'éjection < 40%) et une viabilité résiduelle importante (définie comme > 30% du VG).

- Objectifs secondaires

- Evaluation de la fonction contractile régionale du VG
- Evaluation de la réversibilité du remodelage du VG
- Vérification que la récupération de la fonction contractile s'accompagne d'une amélioration de l'état fonctionnel des patients

Critères d'évaluation

- Critère d'évaluation principal

L'amélioration de la fonction contractile globale sera appréciée en mesurant la fraction d'éjection globale du VG. Une augmentation d'au moins 5 % de cette dernière entre la période préopératoire et le contrôle à 6 mois sera considérée comme un succès. (La comparaison entre la période préopératoire et 1 an sera également réalisée).

Cette fraction d'éjection est mesurée au moyen d'une IRM, grâce à la formule suivante :

$$\{ [(volume\ télédiastolique) - (volume\ télésystolique)] / (volume\ télédiastolique) * 100$$

- Critères d'évaluation secondaires

- La fraction contractile régionale sera évaluée en estimant l'épaississement et la cinétique segmentaire (mesurés par IRM).
- La réversibilité du remodelage du VG sera appréciée en étudiant l'évolution des volumes télédiastolique et télésystolique (mesurés par IRM).
- L'état fonctionnel des patients sera évalué par les 3 critères suivants :

Mesure de la dyspnée par classification NYHA

Calcul du pic de la consommation d'oxygène à l'effort (mesuré au cours de l'épreuve d'effort métabolique)

Mesure de la qualité de vie au moyen d'un questionnaire SF 36.

Population de l'étude

- Critères d'inclusion

- Hommes ou femmes majeurs et âgés de moins de 70 ans
- Patients vivant dans la région d'Auvergne
- Coopération et compréhension permettant de se conformer de façon stricte aux conditions prévues par le protocole
- Personne informée du déroulement du protocole et ayant signé le consentement éclairé
- Affiliation au régime de la sécurité sociale
- Patients acceptant de bénéficier d'un séjour à la clinique cardio-pneumologique de Durtol pour un programme de rééducation

De plus sur le plan cardiovasculaire, les sujets devront respecter les critères suivants :

- Patients devant bénéficier d'une chirurgie de revascularisation coronaire
- Patient souffrant d'une cardiopathie ischémique due à un infarctus datant de plus d'une semaine ou à une hibernation / sidération du myocarde
- Stable sur le plan angineux (SCC II-III) et sur le plan de l'insuffisance cardiaque (NYHA II-III)
- Atteinte pluri-tronculaire revascularisable chirurgicalement
- Rythme sinusal stable

Enfin cette étude s'adresse à des patients souffrant d'une cardiopathie ischémique chronique définie par les critères suivants :

- Dilatation du volume télé systolique $> 50 \text{ ml} / \text{m}^2$ et altération de la contractilité globale définie comme une fraction d'éjection $< 40\%$ (appréciée par IRM)
- Avec une viabilité résiduelle dans des zones hypo contractiles $> 30\%$ de la masse du VG (appréciée par imagerie isotopique par TEP au ^{18}F FDG et TEMP au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi)

- Critères de non inclusion

- Ayant eu un infarctus depuis moins de 3 mois
- Cardiopathie ischémique instable (c'est à dire justifiant une intervention dans des délais ne permettant pas la mise en place du protocole)
- Présence d'une pathologie valvulaire devant bénéficier d'une correction chirurgicale
- Présence d'une cardiopathie congénitale
- Présence de troubles du rythme supra-ventriculaires
- Présence de troubles du rythme ventriculaires graves nécessitant l'implantation d'un défibrillateur

- Présence d'un asynchronisme de contraction inter ou intra-ventriculaire pouvant être traité par la stimulation bi-ventriculaire
- NFS anormale
- Sérologie HIV positive
- Sérologie VHC positive
- Sérologie VHB positive
- Présence d'une néoplasie ou d'une autre condition pathologique rendant le pronostic vital incertain à 2 ans
- Patiente en âge de procréer sans contraception efficace ou enceinte
- Présence d'une contre-indication à la réalisation d'un examen par l'IRM ou par les méthodes isotopiques
- Patient traité par des corticoïdes
- Patient traité par des immunosuppresseurs

- Critères de sortie de l'essai

- Patient pour lesquels il y a apparition de troubles du rythme ventriculaire graves imposant l'implantation d'un défibrillateur (empêchant la réalisation de l'IRM de contrôle)
- Patient faisant l'objet d'une nouvelle intervention chirurgicale

Ces patients bénéficieront d'une surveillance cardiologique rapprochée et il sera discuté d'une implantation d'un stimulateur multisite.

- Description de l'étude

Il s'agit d'une étude pilote, monocentrique, en groupes parallèles, prospective, contrôlée, randomisée et en simple insu.

Deux groupes seront comparés dans cette étude :

- **Groupe A** : patients traités exclusivement par la chirurgie de revascularisation coronaire

- **Groupe B** : patients traités par l'association de la greffe de cellules souches médullaires autologues à la chirurgie de revascularisation.

La répartition des patients dans chaque groupe sera déterminée par tirage au sort.

Cette étude est en simple insu car tout ce qui concerne la greffe des cellules souches autologues (c'est-à-dire la ponction de moelle osseuse et l'injection des cellules) sera réalisé durant l'anesthésie générale du patient et ne lui sera pas divulgué. De plus, les différentes évaluations seront effectuées par des investigateurs ne connaissant pas le groupe auquel appartient le patient.

- Nombre de sujets nécessaires

En se basant sur des travaux de la littérature (Patel 2005) nous faisons l'hypothèse, qu'entre la période préopératoire et le 6ème mois, la fraction d'éjection (critère d'évaluation principale) pourrait être en moyenne améliorée de 8 % dans le groupe A et de 16 % dans le groupe B.

En considérant cet écart de 8 points de fraction d'éjection et avec un écart-type de 5 points (Patel 2005) il faut inclure 14 patients par groupe. Ceci dans une approche bilatérale, avec un risque alpha fixé à 5 % et un risque bêta à 20 %.

En prévoyant des sorties possibles d'étude, nous voulons inclure 30 patients au total.

Déroulement général de l'étude

Tous les patients présentés à l'équipe de Chirurgie Cardiaque du CHU de Clermont-Ferrand (Service du Pr. de Riberolles) pour lesquels une chirurgie de revascularisation est indiquée, entreront dans la procédure de « screening » et constitueront donc la population potentiellement éligible pour cette étude.

Ces patients seront ceux présentés par les centres de cardiologie interventionnelle de la Région d'Auvergne (Services de Cardiologie des Professeurs Cassagnes et Ponsonnaille du CHU et Service de Cardiologie de la clinique des Dômes et du CH de Vichy).

Nous allons sensibiliser les services de cardiologie concernés sur la mise en place de cette étude afin que le recrutement des patients puisse se faire dans de bonnes conditions. Pour cela, une réunion hebdomadaire des investigateurs sera organisée.

Par rapport à la prise en charge habituelle des patients souffrant de ce type de pathologie, et en dehors des procédures liées à la thérapie cellulaire, toutes réalisées le jour de l'intervention, les sujets inclus dans cette étude devront en plus réaliser les visites suivantes:

- la consultation pré-prélèvement (entre J-18 et J-13),
- la visite d'inclusion (entre J-12 et J-7).
- Pratiquer les examens supplémentaires suivants :
 - trois IRM (une en préopératoire, les autres en post-op 6 mois et post-op 1 an),
 - une imagerie isotopique par TEP au 18 FDG et TEMP au Tc99m-sestamibi.

Evaluations préopératoires

- Présélection des patients (J – 30 à J - 20)

Dans un premier temps, la persistance d'une viabilité résiduelle dans les territoires akinétiques sera évaluée en utilisant les examens (échocardiographie sous dobutamine ou méthodes isotopiques) réalisés dans le cadre de la prise en charge habituelle de ces patients.

A ce stade, les critères d'inclusion et de non inclusion (pour lesquels il n'y a pas besoin d'examens supplémentaires) seront vérifiés et le protocole sera expliqué au patient.

- Consultation pré prélèvement (J – 29 à J - 19)

Cette consultation sera réalisée conformément à l'arrêté du 16 décembre 1998 portant sur l'homologation des règles de bonnes pratiques de prélèvement de cellules souches hématopoïétiques. Au cours de celle-ci, le médecin préleveur expliquera au patient le déroulement du prélèvement de moelle osseuse, ainsi que les risques et les conséquences éventuelles, liés à ce prélèvement.

- Réalisation des examens IRM et imagerie isotopiques (J – 18 à J - 13)

Si le patient accepte de participer à cette étude, c'est à ce stade que le consentement par écrit du patient sera recueilli. Il lui sera bien mentionné qu'il n'est pas encore définitivement inclus dans l'étude, car afin de vérifier les critères d'inclusion définissant précisément les caractéristiques de la cardiopathie ischémique, deux examens spécifiquement réalisés dans le cadre de ce protocole, seront pratiqués dans un délai inférieur à 24 heures :

- une imagerie par résonance magnétique avec analyse d'un rehaussement tardif
- une imagerie isotopique par TEP au 18 FDG et TEMP au Tc99m-sestamibi

A la lumière des résultats de ces 2 examens, si le patient respecte tous les critères d'inclusion, il poursuivra l'étude et une visite d'inclusion sera programmée.

- Visite d'inclusion [dont consultation pré-anesthésie] (J – 12 à J – 7)

Après une nouvelle vérification des critères d'inclusion, l'inclusion définitive est réalisée, au cours de cette visite tous les patients bénéficieront :

- d'un examen clinique et biologique habituel complété par le dosage du BNP.
- d'une épreuve d'effort métabolique
- d'un Holter rythmique

Et les patients devront remplir un questionnaire qualité de vie SF36.

Lors de cette visite, la randomisation sera réalisée. Si le patient appartient au groupe B, l'Unité de Thérapie Cellulaire sera prévenue, afin que cette unité puisse en tenir compte dans son planning d'activités.

Par ailleurs, c'est au cours de cette même visite que la consultation pré anesthésie sera réalisée.

Enfin, la veille de l'intervention, le contrôle échocardiographique habituel sera effectué.

- Intervention chirurgicale (J 0)

Le prélèvement de la moelle osseuse, par ponction au niveau du sternum ou des crêtes iliaques, sera réalisé le jour de l'intervention, immédiatement après l'induction de l'anesthésie générale. Le médecin préleveur sera chargé du transfert du prélèvement dans l'unité de thérapie cellulaire, où le greffon cellulaire sera préparé. Le temps écoulé entre le prélèvement de la moelle et le réacheminement du greffon cellulaire sera < 2 heures, donc inférieur au temps nécessaire pour réaliser l'intervention chirurgicale de revascularisation. Les procédures exactes de prélèvement et de préparation du greffon cellulaire sont décrites dans l'annexe II et dans l'annexe III.

A la fin de la procédure de revascularisation chirurgicale, avant le déclampage aortique, l'injection des cellules mononuclées médullaires sera réalisée.

- Modalité d'injection

Les injections seront réalisées à l'aide d'une aiguille 27-gauge de 4 mm dans des zones hibernantes (hypo contractiles mais viables), où la viabilité sera confirmée par les PET scan.

A chaque injection, un volume de 0.2 ml de solution cellulaire sera injecté. Environ 25 injections seront réalisées entre 3 et 5 mm de profondeur, dans la paroi myocardique. Elles seront effectuées dans toutes les zones hibernantes du patient, chacune des injections espacées de l'ordre de 1 cm. Puis une colle de fibrine sera utilisée pour obstruer les trous de ponction, afin d'éviter la régurgitation des cellules injectées.

- Evaluations postopératoires

Post opératoire immédiate

Les patients seront suivis de façon habituelle dans l'unité de réanimation post-chirurgicale du service de chirurgie cardiaque. Les dosages de CPK, de la troponine, de la CRP, seront réalisés deux fois par jour pendant les trois premiers jours. Un ECG sera réalisé tous les jours pendant le séjour des patients en réanimation ; une éventuelle apparition de nouvelles ondes q sera notée dans le cahier d'observation.

Contrôle à la sortie de l'hôpital

Un examen clinique et biologique complet ainsi qu'un ECG 12 dérivations seront réalisés le jour de la sortie. Des éventuelles complications survenues en période d'hospitalisation seront notées dans le cahier d'observation. Un holter rythmique sera posé la veille de la sortie avec

une lecture le jour de la sortie pour s'assurer de l'absence de trouble grave du rythme ventriculaire.

A ce stade, tous les patients inclus dans l'étude bénéficieront d'un séjour à la clinique cardiopneumologique de Durtol pour un programme de rééducation fonctionnelle, après le geste chirurgical. Ce séjour est proposé à tous les patients du service, ayant eu une chirurgie de revascularisation, qui, du fait de leur état myocardique et fonctionnel, le justifient; les patients de la population envisagée pour l'étude en font partie, certains le refusent. . La seule particularité de notre étude est donc le caractère obligatoire de ce séjour (cf. critères d'inclusion).

En effet, il est indispensable que, pour tous les sujets évalués dans cette étude, la prise en charge postopératoire soit la plus homogène possible et qu'ils bénéficient tous d'une prise en charge optimale.

Visite à 1 mois

Il s'agit d'une visite en externe. A l'interrogatoire, les classes d'angor (SCC) (Annexe I) et de dyspnée d'effort seront définies. Un examen clinique, un ECG, un Holter rythmique, et le dosage de BNP seront réalisés lors de ce contrôle. En plus, les patients devront remplir le formulaire qualité de vie SF 36.

Visite à 6 mois

Les mêmes données que lors de la visite au 1er mois seront recueillies. En plus, un examen par imagerie par résonance magnétique, un scanner et une épreuve d'effort métabolique seront réalisés à la même période.

Visites à 1 an

Les mêmes données que lors de la visite au 6ème mois seront recueillies.

Visites à 2 ans

Les mêmes données que lors de la visite au 1er mois seront recueillies.

Définition du produit cellulaire

Matériel cellulaire de départ

Le prélèvement de la moelle osseuse sera donc réalisé par ponction au niveau du sternum ou des crêtes iliaques. La population cellulaire de départ correspond à la population hétérogène constituant la moelle osseuse, composée de cellules hématopoïétiques (cellules souches, progéniteurs, précurseurs et cellules matures) et de cellules non hématopoïétiques (cellules souches et progéniteurs mésenchymateux, autres cellules du microenvironnement).

La moelle osseuse sera aspirée par un trocart jetable de type Malmarmé après forage profond de l'os spongieux. Une aspiration est créée à l'aide d'une seringue en plastique de 20 ml préalablement rincée avec une solution anticoagulante. Le volume cible total de moelle absorbé est compris entre 50 et 100 ml. Le volume exact de moelle osseuse prélevé sera noté.

Par ailleurs les contrôles réalisés sur ce matériel cellulaire sont les suivants :

- numération cellulaire
- viabilité
- bactériologie
- phénotypes CD45 CD34.

Matériel cellulaire final

Les contrôles effectués sur le produit fini et qui sont nécessaires à sa libération par l'Unité Bio Clinique de Prélèvement et Traitement des Cellules Souches Hématopoïétiques sont les suivants :

- les résultats du phénotypage CD45-CD34 ne modifient pas la procédure de libération finale du produit et la greffe puisque le geste est réalisé en pratique avant l'obtention des résultats

- par ailleurs, le greffon sera utilisé à partir du moment où la numération cellulaire sera comprise entre 1×10^8 et 10×10^8 de cellules mononuclées

- en revanche, il nous a paru nécessaire de garantir la qualité des cellules en terme de viabilité et de stérilité. Ainsi, le greffon est adressé au bloc opératoire en même temps que l'échantillon du contrôle de qualité et envoyé au laboratoire. Ce dernier réalise en urgence, une numération et une viabilité (bleu de trypan) ainsi qu'un examen bactériologique direct : tous les résultats seront faxés au bloc opératoire d'une part, et à l'unité de thérapie cellulaire d'autre part.

Critère de libération

Le critère d'utilisation du greffon par le chirurgien est une viabilité $>80\%$ ainsi qu'un examen bactériologique direct négatif.

Les cellules ne seront injectées qu'après réception (Fax) par les chirurgiens des résultats de l'évaluation de la viabilité cellulaire et de l'examen bactériologique direct négatif. En cas de non utilisation, le greffon sera retourné à l'UTC pour destruction selon les procédures validées dans l'unité.

Analyse et interprétation des examens par imagerie

Il est à noter qu'afin de s'inscrire dans une démarche scientifique rigoureuse, l'analyse et l'interprétation de ces examens d'imagerie, permettant notamment l'appréciation du critère d'évaluation principal, sera effectuée par un radiologue n'ayant jamais été en contact avec les patients, de sorte qu'il soit dans l'impossibilité à savoir de quel groupe de patients appartient le cliché à analyser.

IRM avec analyse d'un rehaussement tardif

L'IRM sera réalisée sur un imageur Siemens de 1,5 Tesla (Sonata® ou Avanto®) présentant des temps de montées rapides et doté d'une synchronisation électrocardiographique. Le protocole d'exploration comportera :

- des séquences axiales T1 et T2 centrées sur le thorax à visée morphologique
- des séquences d'écho de gradient synchronisé à l'ECG dans les plans de références (petit axe ventriculaire gauche (VG), grand axe et 4 cavités) afin de mesurer la fraction d'éjection, les volumes ventriculaires (logiciel Argus ®) et d'évaluer la cinétique segmentaire (segmentation AHA : Cerqueira Circulation 2002 ; 105 :539-542)
- après injection d'une demi-dose de chélates de gadolinium à faible rémanence vasculaire (0,05 mmol/kg à 3,5 ml/s) à l'injecteur automatique double corps poussé par 1ml/kg de sérum physiologique, nous effectuerons une analyse quantitative de la perfusion de premier passage (trueFISP) dans le plan du petit axe couvrant l'ensemble du VG
- après un complément d'injection du même produit de contraste (0,15 mmol/kg à 2 ml/s), l'étude du rehaussement tardif sera réalisée à 10 minutes par une séquence d'inversion-récupération (trueFISP 2D IR) dans le plan du petit axe couvrant l'ensemble du VG. Le temps d'inversion myocardique sera évalué pour chaque patient par une séquence préalable (TI

scout). Cette séquence précisera la topographie et le caractère transmural de la prise de contraste, corrélée avec la zone non viable. Ainsi, l'ensemble des paramètres suivant pourra être appréhendé par l'IRM myocardique :

- la fraction d'éjection,
- les volumes télédiastolique et télésystolique VG
- la cinétique segmentaire,
- la viabilité myocardique par l'intermédiaire de :

Hypoperfusion précoce témoignant d'une atteinte de la microcirculation,

Rehaussement tardif corrélé à la cicatrice ischémique non viable.

Réalisée dans le bilan d'inclusion, l'IRM permettra :

- de confirmer l'altération modérée de fonction VG (tenant compte de la sous-estimation fréquente de l'IRM par rapport à l'échographie)
- de mesurer le volume télédiastolique VG de référence
- de préciser une altération de la cinétique segmentaire en précisant notamment les zones d'exploration échographique malaisée du fait de mauvaises fenêtres acoustiques de l'échographie
- d'affirmer le caractère transmural de la cicatrice de nécrose : son absence sur l'IRM initiale étant un critère d'exclusion.

Réalisée lors des contrôles à 6 et 12 mois, l'IRM permettra :

- d'évaluer les variations de fraction d'éjection et de cinétique segmentaire ainsi que son retentissement sur le volume télédiastolique VG
- d'observer une régression de l'hypoperfusion de premier passage et du rehaussement tardif attendue avec l'injection de cellules autologues.

Grille évaluation de l'IRM

- Les volumes ventriculaires gauches

Les volumes télédiastolique (VTD) et télésystolique (VTS) sont calculés à partir d'un contourage semi-automatique des contours endocardiques en télésystole et télédiastole sur l'ensemble des coupes petit axe couvrant le VG (méthode de Simpson).

- Fraction d'éjection (%)

$$FE = (VTD - VTS) / VTD$$

- Hypoperfusion de premier passage

Analyse qualitative : appréciation par le radiologue d'une zone de rehaussement moindre que le myocarde adjacent.

Avantages : réalisation aisée, permettant de s'affranchir des problèmes liés à l'interprétation de l'intensité du signal.

Inconvénients : interprétation subjective.

Cette solution est retenue en pratique par la majorité des autres publications.

- Rehaussement tardif

Une analyse semi-quantitative sera réalisée en fonction de la transmuralité du rehaussement tardif au niveau des différents segments, selon le barème suivant (Schuijf JAC; 2004, 94 :284-288) :

- absent
- 1 à 25% (d'épaisseur sous-endocardique)
- 26 à 50%
- 51 à 75%
- 76 à 100% (transmurale)

- Les paramètres de comparaison

- variation des volumes
- variation de fraction d'éjection
- variation de l'extension de l'hypoperfusion
- variation de l'extension du rehaussement tardif

L'analyse des données de l'examen par l'IRM nous fournira les valeurs des volumes ventriculaires, la valeur de la fraction d'éjection globale du VG, le degré de la transmuralité de la nécrose dans les territoires hypo-contractiles, la cinétique et l'épaississement segmentaire. La contractilité segmentaire sera analysée sur le modèle de 17 secteurs selon les dernières recommandations de l'AHA/ACC task force.

- Un score de 5 degrés est utilisé pour évaluer l'atteinte du myocarde

0 = contractilité normale,

1 = hypokinésie modérée,

2 = hypokinésie sévère,

3 = akinésie,

4 = dyskinésie.

Imagerie isotopique par TEP au 18 FDG et TEMP au Tc99m-sestamibi

L'analyse des données de l'examen isotopique nous fournira des données sur la viabilité myocardique. Cette analyse sera réalisée selon le même modèle de 17 secteurs, utilisé lors de l'examen par l'IRM. La perfusion et le métabolisme myocardique seront analysés de façon quantitative selon la description de l'annexe V. La viabilité des territoires hypo contractiles (score 2 – 4) sera retenue en présence soit d'une perfusion normale (fixation segmentaire du Tc-99m-sestamibi >60%) soit en présence d'un aspect de « mismatch » (fixation segmentaire du Tc-99m-sestamibi < 60% avec une hyperfixation relative (différence > 10%) du 18 FDG). Avec la segmentation à 17 secteurs, la présence de la viabilité dans ≥ 5 secteurs (29.4% du VG) sera nécessaire pour inclure des patients de façon définitive dans l'étude.

Recueil et protection des données

Les données seront recueillies dans le respect du secret de l'identité des personnes participant à l'étude et de toute information à caractère personnel ou médical les concernant.

Pour cela, dans tout document de recueil de données (cahiers d'observation), les patients seront nommés par un code à trois lettres correspondant aux deux premières lettres de leur nom et à la première lettre de leur prénom. La correspondance ne sera connue que des seuls médecins investigateurs.

En accord avec la Loi Informatique et Liberté, les données feront l'objet d'un traitement informatisé anonyme et leur consultation sera autorisée aux collaborateurs participant à la recherche, désignés par le promoteur et éventuellement au représentant des autorités de santé.

Les volontaires se prêtant à la recherche disposeront d'un droit d'accès et de rectification prévu par la loi " informatique et liberté "(Art.40) qui pourra s'exercer à tout moment auprès du Professeur Charles de Riberolles.

Analyse statistique

La description des données se fera sous la forme de moyennes, écarts type, minimum et maximum pour les variables quantitatives; sous la forme de fréquences et de pourcentages pour les variables qualitatives. L'analyse statistique sera réalisée en intention de traiter.

En préopératoire, les données cliniques, angiographiques ainsi que le pourcentage de viabilité résiduelle seront comparés afin de s'assurer de la comparabilité des groupes. Pour cela, un test Khi 2 de Pearson sera utilisé pour les variables qualitatives et un test t de Student ou un test de Mann et Whitney (approche non paramétrique), pour les variables quantitatives.

Concernant le critère d'évaluation principal, les taux d'échec et de succès (cf. IV-1-Critère d'évaluation principal) seront comparés, également au moyen du test de Khi 2 de Pearson, éventuellement réajusté s'il y a un déséquilibre entre les 2 groupes. En fonction de leur caractère qualitatif ou quantitatif, tous les autres critères seront comparés à l'aide des tests mentionnés ci-dessus.

Evaluation bénéfice/risque

Les risques principaux, dans cette étude, sont liés à la procédure de chirurgie cardiaque, procédure qui n'est donc pas propre au protocole puisque les patients bénéficieront de cette chirurgie, qu'ils soient inclus ou non.

Le prélèvement de moelle osseuse ne représente aucun risque, ni aucune séquelle connus à ce jour et le patient ne ressent pas de douleur liée à cette procédure, lors de son réveil. Le seul risque potentiel est celui lié à l'anesthésie générale mais dans notre étude, celle-ci n'est pas réalisée spécifiquement pour le prélèvement.

Concernant la réinjection des cellules mononuclées médullaires, s'appuyant sur les résultats des études cliniques déjà réalisées dans ce domaine, aucun risque prévisible ne peut être recensé. En effet, ce geste de réinjection transépicaire ou transendocardique n'a donné lieu à aucune complication sur plusieurs essais cliniques ayant inclus au total une quarantaine de patients (Caspi 2006).

Dans ce même article (Caspi 2006), qui fait une synthèse de tous les travaux réalisés dans ce type de thérapie cellulaire, les bénéfices retrouvés sont les suivants :

- amélioration de la perfusion des zones injectées
- diminution du volume ventriculaire.
- amélioration de la fraction d'éjection

- amélioration de la classe NYHA (diminution de la dyspnée sur le plan clinique)

Tout ceci permet d'envisager un meilleur pronostic à moyen terme des patients bénéficiant de ce procédé de thérapie cellulaire.

Les différentes étapes pour concentrer un prélèvement de moelle osseuse

Définir la manipulation qui consiste à concentrer rapidement un prélèvement de moelle osseuse en vue d'une réinjection locale dans le muscle cardiaque.

Domaine d'application

Cette opération est effectuée le plus rapidement possible après le prélèvement, au laboratoire de thérapie cellulaire, avant réinjection au bloc cardio où le patient attend sous anesthésie générale.

Procédure :

- Le prélèvement est effectué au bloc cardio à St Jacques selon la technique utilisée pour les prélèvements de moelle osseuse en vue de greffe. .\Classeur TP G7\FT\FT N° 2 Prélèvement de MO.doc. Le volume prélevé est de 50 ml. Le transport est assuré par le médecin de l'UBC qui participe au prélèvement avec une navette urgente du CHU.
- Avant d'entrer dans le laboratoire, s'assurer du début du prélèvement de MO au bloc en appelant la surveillante du bloc au 04 73 751 575
- Réception du PC : ..\MO\MO N° 4 Réception et enregistrement.doc
- La MO sera réceptionnée par une technicienne à l'extérieur du laboratoire. La 2ème technicienne attend la moelle dans le laboratoire (elle est prête à travailler).

- S'assurer que le prélèvement est identifié par une étiquette patient. Vérifier l'intégrité du produit cellulaire. Donner la poche par le sas matériel à la technicienne qui l'attend dans le laboratoire. Vérifier que l'ensemble des documents nécessaires à la traçabilité est présent.

Transformation

Toutes les manipulations se font dans le labo L3 (ISO 7)

- Avant l'arrivée de la poche de MO, préparer sous la hotte tout le matériel nécessaire à la manipulation et à la prise d'échantillons. Préparer dans une poche cryocyte 250 ml de solution de lavage : NaCL 0,9% + 5% albumine + héparine 250 UI/ml.
- Poser un site d'injection sur la poche de MO, filtrer la moelle et prélever des échantillons : hématologie 0,5 ml, cultures 0,5 ml et bactériologie 0,5 ml.
- Préparer 3 tubes Falcon de 50 ml avec 25 ml de polyfluorocarbène liquide (Ficoll, Biotech, densité 1,077) chacune. Prélever la moelle dans la poche à l'aide d'une seringue de 50 ml et déposer en gradient de densité dans 3 tubes Falcon de 50 ml, au-dessus d'une couche de 25 ml de Ficoll, 25 ml de moelle par tube. Fermer les tubes sous la hotte.
- Centrifuger les 3 tubes pendant 25 min à 700 g à la température ambiante (centrifugeuse Juan). Après centrifugation, les cellules mononucléées se rassemblent en un anneau opaque surnageant au dessus du Ficoll.
- Sous la hotte, recueillir délicatement la couche de globules blancs à la limite supérieure de la couche de Ficoll à l'aide d'une aiguille + seringue.
- Lavage 1 : resuspendre les globules blancs recueillis dans 50 ml de solution de lavage et recentrifuger 10 min dans les mêmes conditions. Les cellules forment après cette deuxième centrifugation un culot blanc au fond du tube. Reprendre le culot à l'aide d'une aiguille + seringue.

- Lavage 2 : resuspendre les globules blancs recueillies dans 50 ml de solution de lavage et recentrifugés 10 min dans les mêmes conditions. Les cellules forment après cette troisième centrifugation un culot blanc au fond du tube. Reprendre le culot à l'aide d'une aiguille + seringue.
- Resuspension finale : resuspendre les globules blancs recueillis dans la solution de lavage 5,6 ml et transférer dans une poche cryocyte de 50 ml

Contrôles de qualité et envoi du produit cellulaire

- Prélever dans la poche (via une tubulure à vis) les contrôles qualité.
 - Bactériologie 0,2 ml
 - Hématologie 0,2 ml
 - Cultures 0,2 ml
- Volume final du produit = 5 ml. Souder toutes les tubulures à vis de la poche (sauf la tubulure avec le site d'injection qui servira à reprendre les cellules dans une seringue au bloc), mettre la poche dans un champ stérile, passer dans le sas de sortie.
- Un technicien à l'extérieur du laboratoire met la poche et la fiche de suivi dans une boîte isotherme et accompagne le produit cellulaire au bloc cardio. (navette du CHU)
- Envoi de résultat au chirurgien cardiaque.

Bilan en avril 2010 :

Devant le nombre faible de patients répondant aux critères d'inclusion, un amendement pour modification des critères d'inclusion au protocole a été déposé et accepté :

- Critère n°1

Dans le projet initial, la dilatation du volume télé systolique devait être supérieur à > 130 ml ; cette valeur est remplacée par $50 \text{ ml} / \text{m}^2$.

Justification : Cette dernière valeur ($50 \text{ ml} / \text{m}^2$) est considérée comme valeur seuil pour la réalisation d'une plastie ventriculaire selon la méthode de Vincent Dor (DOR 2008)

- Critère n°2

La durée de la stabilité de la cardiopathie sur le plan hémodynamique, initialement fixée à 3 mois, est raccourcie à une semaine. En effet, les patients porteurs d'une cardiopathie ischémique évoluée, avec une altération importante de la contractilité ventriculaire gauche, présentent très souvent des lésions coronaires extrêmement sévères qui font que l'attente de 3 mois peut s'avérer néfaste pour leur santé.

- Critère n°3

Le critère suivant : hommes ou femmes majeurs et âgés de moins de 70 ans est remplacé par
hommes ou femmes majeurs et âgés de moins de 80 ans

- Critère n°4

Le critère suivant : dilatation du volume télé systolique $> 50 \text{ ml} / \text{m}^2$ et altération de la contractilité globale définie comme une fraction d'éjection $< 40\%$ (appréciée par IRM) est remplacé par

dilatation du volume télé systolique $> 50 \text{ ml} / \text{m}^2$ et altération de la contractilité globale définie comme une fraction d'éjection inférieure ou égale à 40% (appréciée par IRM)

Actuellement 9 patients sont inclus dans l'étude dont :

4 dans le groupe thérapie cellulaire :

- 1 sorti d'étude à 8 mois (mise en place d'un défibrillateur)
- 1 décès à 6 mois
- 1 est à 1 an de suivi (visite prévue le 17 mars)
- 1 a eu l'intervention il y a moins d'un mois

5 patients pour le groupe contrôle :

- 1 aura sa visite de suivi de 2 ans en juin 2010
- 1 a été exclu juste avant l'intervention (crise de goutte)
- 1 est à 1 an de suivi (visite prévue le 24 mars)
- 2 ont eu l'intervention il y a moins d'un mois

VI- Perspectives et valorisation

Perspectives

La thérapie cellulaire myocardique est une des voies de recherche les plus prometteuses pour la prise en charge des patients en insuffisance cardiaque. La recherche en laboratoire offre de nombreuses pistes qui sont pour certaines explorées par la clinique humaine. Au vu de la littérature, et en attendant les résultats du PHRC local, qui a pour unique but de montrer la faisabilité d'un tel protocole sur le centre hospitalier de Clermont Ferrand, il est désormais clair que nous ne possédons pas encore la clé de la réussite de la thérapie cellulaire myocardique. Absolument tous les points sont à revoir.

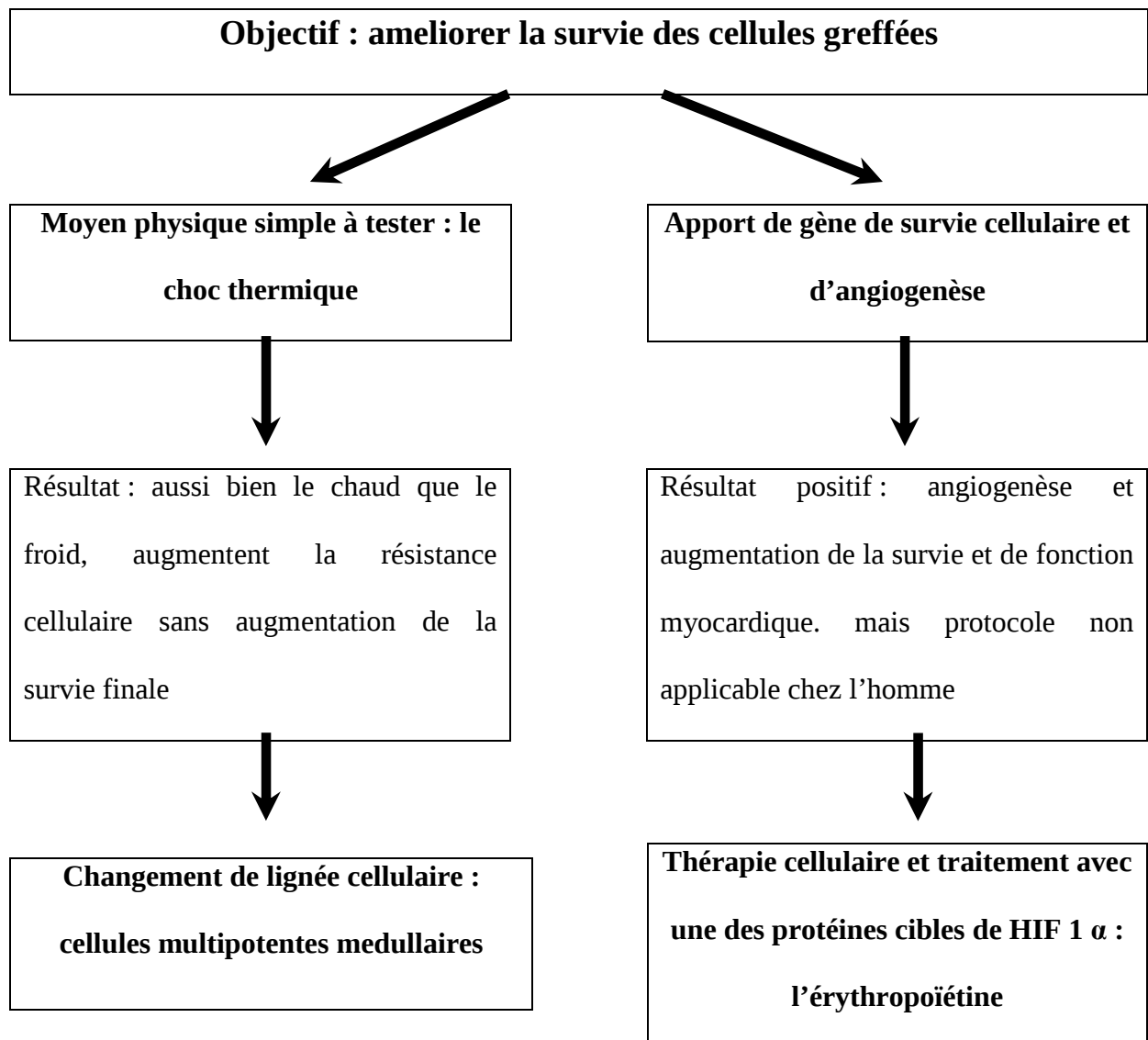
Le type de cellule bien évidemment en premier lieu. La première génération de toutes les lignées cellulaires thérapeutiques « classiques » apporte une réponse insuffisante. Une deuxième génération de ces cellules pourrait constituer une réponse plus adaptée. L'apport de facteurs de résistance à l'apoptose et à la nécrose ischémique est une voie à développer. Les cellules souches de type embryonnaire sont d'expérimentation et d'utilisation limitées par l'éthique et par la loi. Des résultats encourageants (Blin 2010) sont en cours d'exploration. Un mélange de plusieurs lignées cellulaires thérapeutiques classiques peut également constituer une piste de recherche. Des cellules souches à orientation musculaire et des cellules souches hématopoïétiques peuvent avoir des propriétés complémentaires intéressantes. Les voies d'administration doivent également progresser. L'injection artisanale de produits de thérapie cellulaire et de facteurs de croissance en intra-coronaire, dans l'endocarde ou dans l'épicarde doit devenir plus précise, avec des injecteurs dédiés, tenant compte de l'épaisseur des zones à traiter et de la taille et morphologie des cellules transplantées. La recherche d'un support équivalent à la matrice extracellulaire, permettant une meilleure survie du greffon cellulaire

est également une des nombreuses pistes étudiées. Les zones à traiter sont également à revoir. Devons nous traiter la zone d'infarctus, le territoire bordant la cicatrice d'infarctus, les zones ischémiques sans nécrose ou la totalité du myocarde ? La planification dans le temps de la transplantation peut également être un facteur important à ne pas négliger. Le rôle de l'inflammation provoquée par l'ischémie locale et par l'agression que provoque une greffe cellulaire est encore mal évalué.

Un protocole de recherche spécifique peut être consacré à chaque étape. L'élaboration par l'industrie d'un injecteur de cellule dédié, constitue un axe de recherche à développer rapidement. Il faudra à l'avenir des aiguilles permettant une injection en profondeur désirée, sans espace mort permettant la délivrance de produits de thérapie cellulaire sans altération.

D'autre part, soit un mélange de deux lignés thérapeutiques (par exemple cellules de soutien de l'angiogenèse et cellules à orientation contractile) soit d'une lignée cellulaire et de cytokines spécifiques seront intéressants à développer en pré clinique. La chronologie d'apport de cytokines et la concentration intramyocardique idéale de ces derniers comme l'érythropoïétine sont à explorer.

Valorisation



VII- Conclusion

Finally, the myocardial cellular therapy is still a very young discipline. It has already allowed us to better understand cellular differentiation and to find human myocardial stem cells (even if it is in very small quantities). It clearly represents one of the most promising research avenues in cardiology. The development of different products and the means of extraction, culture and administration must be the subject of research and specific industrial production in order to fully benefit from the perspectives offered.

The experimental work has been carried out in the laboratory of Study of Grafts and Cardiac Prostheses of the Broussais Hospital, labeled by the National Institute of Health and Medical Research (INSERM), unit 633, under the direction of Professor Philippe Menasché. The PHRC is currently taking place at the CHU of Clermont-Ferrand.

VIII- Référence

Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, Delurgio DB, Leon AR, Loh E, Kocovic DZ, Packer M, Clavell AL, Hayes DL, Ellestad M, Trupp RJ, Underwood J, Pickering F, Truex C, McAtee P, Messenger J; MIRACLE Study Group. Multicenter InSync Randomized Clinical Evaluation. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Jun 13;346(24):1845-53.

Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Léobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagège A, Samuel JL, Menasché P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:458-63.

Agbulut O, Coirault C, Niederländer N, Huet A, Vicart P, Hagège A, Puceat M, Menasché P. GFP expression in muscle cells impairs actin–myosin interactions: implications for cell therapy. *Nat Methods* 2006;3:331.

Al Attar N, Carrion C, Ghostine S, Garcin I, Vilquin JT, Hagège AA, Menasché P. Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* 2003;58(1):142-8.

Alexandre H. A history of mammalian embryological research. *Int J Dev Biol*. 2001;45(3):457-67.

Alghamdi AA, Albanna MJ, Guru V, Brister SJ. Does the use of erythropoietin reduce the risk of exposure to allogeneic blood transfusion in cardiac surgery? A systematic review and meta-analysis. *J Card Surg* 2006;21:320-6.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bonemarrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425:968 –73.

Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;12;324(7329):71-86.

Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* 2003;76:1123-30.

Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 2003;229:838-46.

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on

stem-cell homing and tissue regeneration in ischemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703.

Azarnoush K, Maurel A, Sebbah L, Carrion C, Bissery A, Mandet C, Pouly J, Bruneval P, Hagège AA, Menasché P. Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by co-administration of hypoxia-inducible factor 1 α . *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130(1):173-9.

Baker DW, Jones R, Hodges J, Massie BM, Konstam MA, Rose EA. Management of heart failure. III. The role of revascularization in the treatment of patients with moderate or severe left ventricular systolic dysfunction. *JAMA* 1994;272:1528-34.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668-73.

Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J*. 1967;30;41(48):1271-4.

Bax JJ, Poldermans D, Elhendy A, Cornel JH, Boersma E, Rambaldi R, Roelandt JR, Fioretti PM. Improvement of left ventricular ejection fraction, heart failure symptoms and prognosis after revascularization in patients with chronic coronary artery disease and viable myocardium detected by dobutamine stress echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:163-9.

Bax JJ, Visser FC, Poldermans D, Elhendy A, Cornel JH, Boersma E, Valkema R, Van Lingen A, Fioretti PM, Visser CA. Relationship between preoperative viability and postoperative improvement in LVEF and heart failure symptoms. *J Nucl Med* 2001;42:79-86.

Bax JJ, Schinkel AF, Boersma E, Elhendy A, Rizzello V, Maat A, Roelandt JR, van der Wall EE, Poldermans D. Extensive left ventricular remodeling does not allow viable myocardium to improve in left ventricular ejection fraction after revascularization and is associated with worse long-term prognosis. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11 Suppl 1):II18-22.

Beauchamp JR, Pagel CN, Partridge TA. A dual-marker system for quantitative studies of myoblast transplantation in the mouse. *Transplantation* 1997; 63(12): 1794.

Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999;144(6): 1113-22.

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

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.

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. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):1125-39.

Bouchentouf M, Benabdallah BF, Tremblay JP. Myoblast survival enhancement and transplantation success improvement by heat-shock treatment in mdx mice. *Transplantation* 2004;77(9):1349-56.

Butler, J. Kalogeropoulos A. Worsening heart failure hospitalization epidemic we do not know how to prevent and we do not know how to treat! *J Am Coll Cardiol*, 2008;52(6):435-7.

Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273(27):17147-53.

Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4802-6.

Caspi O, Gepstein L. Regenerating the heart using human embryonic stem cells--from cell to bedside. *Isr Med Assoc J*. 2006 Mar;8(3):208-14.

Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of heat-shock protein 70 and P53 proteins in attenuation of UVC-induced apoptosis by thermal stress in hepatocellular carcinoma cells. *Photochem Photobiol* 1999;70(1):78-86.

Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovascularity formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(3):654-60.

Cimochowski GE, Harostock MD, Foldes PJ. Minimal operative mortality in patients undergoing coronary artery bypass with significant left ventricular dysfunction by maximization of metabolic and mechanical support. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:655-64.

Cohn JN, Bristow MR, Chien KR, Colucci WS, Frazier OH, Leinwand LA, Lorell BH, Moss AJ, Sonnenblick EH, Walsh RA, Mockrin SC, Reinlib L. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation*, 1997;95(4):766-70.

Copeland JG, Smith RG, Arabia FA, Nolan PE, Sethi GK, Tsau PH, McClellan D, Slepian MJ. Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation. *N Engl J Med*, 2004;351(9):859-67.

Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. *Lancet*. 2001;5;357(9266):1385-90.

Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P, Bolli R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 8;102(10):3766-71.

Depping R, Kawakami K, Ocker H, Wagner JM, Heringlake M, Noetzold A, Sievers HH, Wagner KF. Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:877-8.

Dib N, Menasche P, Bartunek JJ, Zeiher AM, Terzic A, Chronos NA, Henry TD, Peters NS, Fernández-Avilés F, Yacoub M, Sanborn TA, Demaria A, Schatz RA, Taylor DA, Fuchs S, Itescu S, Miller LW, Dinsmore JH, Dangas GD, Popma JJ, Hall JL, Holmes DR Jr. Recommendations for Successful Training on Methods of Delivery of Biologics for Cardiac Regeneration: A Report of the International Society for Cardiovascular Translational Research. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 2010 Mar;3(3):265-75.

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005;115:572-583.

Dor V, Civaia F, Alexandrescu C, Montiglio F. The post-myocardial infarction scarred ventricle and congestive heart failure: the preeminence of magnetic resonance imaging for preoperative, intraoperative, and postoperative assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008 Dec;136(6):1405-12.

Essers J, de Stoppelaar JM, Hoebee B. A new rat repetitive DNA family shows preferential localization on chromosome 3, 12 and Y after fluorescence in situ hybridization and contains a subfamily which is Y chromosome specific. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 69(3-4):246-52.

Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*. 2001 May;37(6):1726-32.

Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, Waksman R, Weissman NJ, Cerqueira M, Leon MB, Epstein SE. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 21;41(10):1721-4.

Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, Baffour R, Aggarwal A, Weissman NJ, Cerqueira M, Waksman R, Serruys P, Battler A, Moses JW, Leon MB, Epstein SE. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006 Mar 15;97(6):823-9.

Fujii T, Yau TM, Weisel RD, Ohno N, Mickle DA, Shiono N, Ozawa T, Matsubayashi K, Li RK. Cell transplantation to prevent heart failure: a comparison of cell types. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:2062-70.

Gheorghiade M, Bonow RO. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. *Circulation* 1998;97:282-9.

Gruh I, Beilner J, Blomer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Kruse ML, Haverich A, Martin U. No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation*. 2006;113:1326-34.

Guérette B, Skuk D, Célestin F, Huard C, Tardif F, Asselin I, Roy B, Goulet M, Roy R, Entman M, Tremblay JP. Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol* 1997; 159(5):2522-31.

Hale SL, Sesti C, Kloner RA. Administration of erythropoietin fails to improve long-term healing or cardiac function after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46:2115.

Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Närvänen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M, Ylä-Herttuala S. Safety and Feasibility of Catheter-Based Local Intracoronary Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transfer in the Prevention of Postangioplasty and In-Stent Restenosis and in the Treatment of Chronic Myocardial Ischemia. *Circulation*. 2003 Jun 3;107(21):2677-83.

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rhim C, Martin H, Zeiher AM. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340-6.

Hendriks M, Hensen K, Clijsters C, Jongen H, Koninckx R, Bijnsens E, Ingels M, Jacobs A, Geukens R, Dendale P, Vijgen J, Dilling D, Steels P, Mees U, Rummens JL. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation. Results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I101-7.

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

Henning RJ, Abu-Ali H, Balis JU, Morgan MB, Willing AE, Sanberg PR. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the treatment of acute myocardial infarction. *Cell Transplant*. 2004;13(7-8):729-39.

Herreros J, Prósper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sánchez PL, Cañizo C, Rábago G, Martí-Climent JM, Hernández M, López-Holgado N, González-Santos JM, Martín-Luengo C, Alegria E. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003;24:2012-20.

Honda S, Weigel A, Hjelmeland LM, Handa JT. Induction of telomere shortening and replicative senescence by cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Mar 30;282(2):493-8.

Hughes GC, Biswas SS, Yin B, Coleman RE, DeGrado TR, Landolfo CK, Lowe JE, Annex BH, Landolfo KP. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg*. 2004;77:812-6.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation*. 2009;119(14):e391-479.

Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuée J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation*. 2009;119(18):2471-9.

Jiang C, Lu H, Vincent KA, Shankara S, Belanger AJ, Cheng SH, Akita GY, Kelly RA, Goldberg MA, Gregory RJ. Gene expression profiles in human cardiac cells subjected to hypoxia or expressing a hybrid form of HIF-1. *Physiol Genomics*. 2002;8:23-32.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.

Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100 (Suppl 1):11854-60.

Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-6.

Kim EJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, Sakai T, Yau TM. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122:963-71.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-85.

Kofidis T, de Bruin JL, Yamane T, Balsam LB, Lebl DR, Swijnenburg RJ, Tanaka M, Weissman IL, Robbins RC. Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. *Stem Cells* 2004;22:1239-45.

Krause KT, Jaquet K, Geidel S, Schneider C, Mandel C, Stoll HP, Hertting Harle T, Kuck KH. Percutaneous endocardial injection of erythropoietin: assessment of cardioprotection by electromechanical mapping. *Eur J Heart Fail* 2006;8:443-50.

Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005;433:647-53.

Lee KS, Marwick TH, Cook SA, Go RT, Fix JS, James KB, Sapp SK, MacIntyre WJ, Thomas JD. Prognosis of patients with left ventricular dysfunction, with and without viable myocardium after myocardial infarction. Relative efficacy of medical therapy and revascularisation. *Circulation*. 1994 Dec;90(6):2687-94.

Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, Rao V, Ivanov J. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:654-60.

López-Cuenca A, Marín F, Roldán V, Climent VE, Valdés M, Lip GY. Effects of atorvastatin 80 mg daily on indices of matrix remodelling in 'high-risk' patients with ischemic heart disease. *Int J Cardiol*. 2010;18;139(1):95-7.

Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *J Am Med Assoc* 2005;293:90-95.

Makkar RR, Lill M, Chen P-S. Stem cell therapy for myocardial repair. Is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2070-2.

Mansour S, Vanderheyden M, De Bruyne B, Vandekerckhove B, Delrue L, Van Haute I, Heyndrickx G, Carlier S, Rodriguez-Granillo G, Wijns W, Bartunek J. Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr 18;47(8):1727-30.

Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004;364:183-92.

Maurel A, Azarnoush K, Sabbah L, Vignier N, Le Lorc'h M, Mander C, Bissery A, Garcin I, Carrion C, Fisman M, Bruneval P, Hagege A, Carpentier A, Vilquin JT, Menasche P. Can cold or heat shock improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium? *Transplantation* 2005;80:660-666.

McAlister FA, Tu JV, Newman A, Lee DS, Kimber S, Cujec B, Armstrong PW. How many patients with heart failure are eligible for cardiac resynchronization? Insights from two prospective cohorts. *Eur Heart J*. 2006 Feb;27(3):323-9.

Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001 Jan 27;357(9252):279-80.

Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1078-83.

Menasché P. Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004;2:21-8.

Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.* 2004;95:911-21.

Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, Xiao YF. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol.* 2002;92:288-96.

Mocini D, Staibano M, Mele L, Giannantoni P, Menichella G, Colivicchi F, Sordini P, Salera P, Tubaro M, Santini M. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am Heart J.* 2006 Jan;151(1):192-7.

Moelker AD, Baks T, Wever KM, Spitskovsky D, Wielopolski PA, van Beusekom HM, van Geuns RJ, Wnendt S, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Intracoronary delivery of umbilical cord blood derived unrestricted somatic stem cells is not suitable to improve LV function after myocardial infarction in swine. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Apr;42(4):735-45.

Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11612-7.

Moon C, Krawczyk M, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:243-250.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20(19):7146-59.

Mosterd, A. Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*, 2007;93(9):1137-46.

Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest.* 1996;98:2512-23.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-8.

Odani M, Komatsu Y, Oka S, Iwahashi H. Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiology* 2003;47(2):155-64.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12313-18.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-5.

Ott HC, Bonaros N, Marksteiner R, Wolf D, Margreiter E, Schachner T, Laufer G, Hering S. Combined transplantation of skeletal myoblasts and bone marrow stem cells for myocardial repair in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25:627-34.

Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL; Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group.. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2001 May 31;344(22):1651-8.

Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003; 112:999-1007.

Patel AN, Geffner L, Vina R, Saslavsky J, Urschel H, Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1631-38.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Tranendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2294-302.

Pfeffer, M.A. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med*, 1995;46:455-66.

Piao H, Youn TJ, Kwon JS, Kim YH, Bae JW, Bora S, Kim DW, Cho MC, Lee MM, Park YB. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:730-38.

Pouzet B, Vilquin JT, Hagège AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasché P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation* 2000;102(Suppl 3):III210-5.

Pouzet B, Vilquin JT, Hagège AA, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Menasché P. Factors affecting functional outcome following autologous skeletal myoblast transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:844-50.

Prat-Vidal C, Roura S, Farré J, Gálvez C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Garcia J, Cinca J, Bayes-Genis A. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc*. 2007 Sep;39(7):2434-7.

Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164-9.

Reinecke H, Murry CE. Transmural replacement of myocardium after skeletal myoblast grafting into the heart. Too much of a good thing? *Cardiovasc Pathol*. 2000;9:337-44.

Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:241-9.

Reinecke H, Minami E, Zhu WZ, Laflamme MA. Cardiogenic Differentiation and Transdifferentiation of Progenitor Cells. *Circ Res*. 2008;103:1058-71.

Retuerto MA, Schalch P, Patejunas G, Carbray J, Liu N, Esser K, Crystal RG, Rosengart TK. Angiogenic pretreatment improves the efficacy of cellular cardiomy- oplasty performed with fetal cardiomyocyte implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127:1041-50.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-46.

Roti Roti JL, Mackey MA, Higashikubo R. The effects of heat shock on cell proliferation. *Cell Prolif*. 1992 Mar;25(2):89-99.

Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res*. 2003;92:1217-24.

Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K, Yamamoto M, Lu F, Tabata Y, Komeda M. Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124:50-6.

Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM.. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. Final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1690-9.

Scherschel JA, Soonpaa MH, Srouf EF, Field LJ, Rubart M. Adult bone marrow-derived cells do not acquire functional attributes of cardiomyocytes when transplanted into peri-infarct myocardium. *Mol Ther*. 2008;16:1129-37.

Schinkel AF, Bax JJ, Boersma E, Elhendy A, Roelandt JR, Poldermans D. How many patients with ischemic cardiomyopathy exhibit viable myocardium? *Am J Cardiol* 2001;88:561-4.

Schinkel AF, Poldermans D, Rizzello V, Vanoverschelde JL, Elhendy A, Boersma E, Roelandt JR, Bax JJ. Why do patients with ischemic cardiomyopathy and a substantial

amount of viable myocardium not always recover in function after revascularization? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:385-90.

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-302.

Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L, Menasché P. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation*. 1996;1;94(9 Suppl):II337-40.

Scorsin M, Hagège A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasché P. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119(6):1169-75.

Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8(suppl):S62-7.

Semenza GL. Hypoxia inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5680-4.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *AnnThorac Surg*. 2002;73:1919-25.

Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324:481-8.

Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, Kobayashi H, Kato T, Umeda K, Yoshimoto M, Nakahata T. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Exp Cell Res*. 2007;313:1008-23.

Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P, Chang H. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1/VP-16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in rat. *Cardiovasc Res*. 2002;54:576-83.

Siegenthaler MP, Westaby S, Frazier OH, Martin J, Banning A, Robson D, Pepper J, Poole-Wilson P, Beyersdorf F. Advanced heart failure: feasibility study of long-term continuous axial flow pump support. *Eur Heart J* 2005.26(10):1031-8.

Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzeźniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of post-infarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004;148:531-7.

Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O, Grygielska B, Rozwadowska N, Kałmucki P, Kurpisz M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005;26:1188-95.

Skuk D, Caron N, Goulet M, Roy B, Espinosa F, Tremblay JP. Dynamics of the early immune cellular reactions after myogenic cell transplantation. *Cell Transplant* 2002;11(7):671-81.

Skuk D, Caron N, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62(9):951-67.

Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH, Maat AP, Serruys PW. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:2063-9.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary monocuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1913-8.

Suzuki K, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Brand NJ, Yacoub MH. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 2000;102(Suppl 3):III216-21.

Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Sammut IA, Suzuki N, Kaneda Y, Yacoub MH. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor expressing skeletal myoblasts. *Circulation*. 2001;104(suppl I):I207-12.

Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppen SR, Partridge TA, Yacoub MH. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J* 2004;18(10):1153-5.

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

Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X, Nishimura K, Komeda M. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation* 2003;108(Suppl 2):II259-63.

Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998; 4:929-33.

Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Aurora P, Christie J, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report 2007. *J Heart Lung Transplant*, 2007.26(8):769-81.

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC,, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957 Sep 12;257(11):491-6.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-47.

Tillisch J, Brunken R, Marshall R, Schwaiger M, Mandelkern M, Phelps M, Schelbert H. Reversibility of cardiac wall-motion abnormalities predicted by positron tomography. *N Engl J Med*. 1986 Apr 3;314(14):884-8.

Tolar J, O'shaughnessy MJ, Panoskaltsis-Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Riddle M, McIvor RS, Yant SR, Kay MA, Krause D, Verfaillie CM, Blazar BR. Host factors that impact the biodistribution and persistence of multipotent adult progenitor cells. *Blood*. 2006 May 15;107(10):4182-8.

Trachiotis GD, Weintraub WS, Johnston TS, Jones EL, Guyton RA, Craver JM. Coronary artery bypass grafting in patients with advanced left ventricular dysfunction. *Ann Thorac Surg* 1998;66:1632-9.

Tremblay JP, Vilquin JT. Transplantation of normal or genetically modified myoblasts for the treatment of hereditary or acquired diseases. *J Soc Biol*. 2001;195:29-37.

Tse H-F, Kwong Y-L, Chan JKF, Lo G, Ho C-L, Lau C-P. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-9.

Van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, Van der Velden J, Voors AA, Van Veldhuisen DJ, Van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythro-poietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:125-133.

Vieyra DS, Jackson KA, Goodell MA. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem Cell Rev*. 2005;1:65-9.

Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, Goldberg MA, Akita GY, Gregory RJ, Isner JM. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 /VP-16 hybrid transcription factor. *Circulation*. 2000;102:2255-61.

Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Harnessing the response to tissue hypoxia: HIF-1 and therapeutic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:362-7.

Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol*. 2010 Jan;47(1):3-12.

Wang Y, Knowlton AA, Christensen TG, Shih T, Borkan SC. Prior heat stress inhibits apoptosis in adenosine triphosphate-depleted renal tubular cells. *Kidney Int*. 1999 Jun;55(6):2224-35.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.

Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G. plantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 2005;16:245-55.

Yamaguchi A, Ino T, Adachi H, Mizuhara A, Murata S, Kamio H. left ventricular volume predicts postoperative course in patients with ischemic cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg*. 1995 Oct;60(4):1059-62.

Yamashita N, Hoshida S, Nishida M, Igarashi J, Taniguchi N, Tada M, Kuzuya T, Hori M. Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(7):1805-13.

Yang Y, Min JY, Rana JS, Ke Q, Cai J, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. *J Appl Physiol*. 2002;93:1140-51.

Yau TM, Li G, Weisel RD, Reheman A, Jia ZQ, Mickle DA, Li RK. Vascular endothelial growth factor transgene expression in cell-transplanted hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127:1180-7.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000;20;342(3):145-53.

Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Alla F, Virion JM. Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL study. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:458-69.

Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Suntharalingam P, Boozer S, Mhashilkar A, Panetta CJ, Swingen C, Deans R, From AH, Bache RJ, Verfaillie CM, Zhang J. Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation*. 2007;115:1866-75.

Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:907-21.

IX- Abstracts et articles cités dans la thèse

Can Cold or Heat Shock Improve Skeletal Myoblast Engraftment in Infarcted Myocardium?

Agnès Maurel, Kasra Azarnoush, Laurent Sabbah, Nicolas Vignier, Marc Le Lorc'h, Chantal Mandet, Alvine Bissery, Isabelle Garcin, Claire Carrion, Marc Fiszman, Patrick Bruneval, Alain Hagege, Alain Carpentier, Jean-Thomas Vilquin, Philippe Menasché

Objectif : La mort cellulaire reste une limitation majeure de la greffe de myoblastes squelettiques (MS), mais les profils de survie et de prolifération cellulaires dans le cœur et leur modulation possible par des stress thermiques comme le choc induit par la chaleur (heat shock : HS) ou par le froid (Cryo-congélation : Cryo) sont encore mal caractérisés.

Méthodes : Pour détecter les MS in situ, nous avons mis au point un système de double marqueur fondé sur l'expression semi-conservatrice de la protéine soluble, β -Galactosidase (β -Gal) et l'expression constitutive du chromosome Y dans un modèle d'infarctus du myocarde. À cet effet, un milieu de culture (groupe contrôle) ou des MS de rats Lewis mâles (frais ou soumis à un choc Cryo ou HS) ont été injectés dans le myocarde de rats Lewis femelles.

Résultats : Nous avons observé une déperdition cellulaire massive juste après la greffe dans le groupe ayant reçu des MS frais, qui n'a été que partiellement compensée par une prolifération ultérieure. En revanche, le traitement Cryo et HS a significativement amélioré la survie cellulaire précoce mais a diminué la prolifération ultérieure si bien que 15 jours après la greffe, le nombre total de cellules greffées Y-positives dérivées du donneur n'était pas significativement différent dans les trois groupes. La plupart de ces cellules exprimait un phénotype de muscle squelettique.

Conclusions : Ces données confirment le taux élevé de mort cellulaire des myoblastes greffés dans la cicatrice, démontrent la capacité des cellules survivantes à proliférer et à avoir une différenciation myogène mais ne corroborent pas la capacité du traitement Cryo ou HS à augmenter l'ampleur finale de la greffe de myoblastes.

Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1 α

Kasra Azarnoush, MD, Agnès Maurel, PhD, Laurent Sebbah, MD, Claire Carrion, Alvine Bissery, MSc, Chantal Mandet, Julia Pouly, MD, Patrick Bruneval, MD, Albert A. Hagège, MD, PhD et Philippe Menasché, MD, PhD

Objectif : La mort cellulaire précoce reste une importante limitation de la greffe de myoblastes squelettiques. La vascularisation insuffisante des zones cicatricielles cibles contribuant à la perte cellulaire, nous avons donc évalué les effets de l'association d'une greffe de myoblastes squelettiques à l'administration du facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α (HIF-1 α), un gène maître qui régule l'expression d'une grande variété de facteurs angiogéniques.

Méthodes : Un infarctus du myocarde a été créé chez 56 rats par le biais d'une ligature d'une artère coronaire. Huit jours plus tard, les rats ont été affectés de manière aléatoire en 4 groupes recevant, par injection au niveau des zones cicatricielles, du milieu de culture (animaux témoins, n = 11), des myoblastes squelettiques (5×10^6 , n = 13), du facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α codé par un adénovirus ($1,0 \times 10^{10}$ ufp/ml, n = 7) ou des myoblastes squelettiques (5×10^6) en association avec un vecteur vide (n = 3) ou avec le facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α actif ($1,0 \times 10^{10}$ ufp/ml, n = 13). Un cinquième groupe (n = 9) a été soumis à une approche par étapes au cours de laquelle le facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α ($1,0 \times 10^{10}$ ufp /ml) a été injecté au moment de l'infarctus, suivi par les myoblastes squelettiques (5×10^6) huit jours plus tard. La fonction ventriculaire gauche a été évaluée par échographie avant la greffe et un mois après celle-ci. Les cœurs explantés ont ensuite été soumis à un examen immunohistochimique afin de détecter des myotubes, quantificateurs de l'angiogenèse, de la prise de la greffe et de la survie cellulaire.

Résultats : Les groupes ne présentaient aucune différence significative quant aux fractions d'éjection initiales (35 %-40 %). Au bout d'un mois, la fraction d'éjection avait diminué par rapport à la valeur initiale dans les cœurs témoins et chez ceux qui avaient reçu le facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α . En revanche, elle ne s'était pas dégradée après l'injection de myoblastes squelettiques seuls ou associés au vecteur vide ou au facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α actif administré de manière séquentielle. L'évolution la plus surprenante est survenue dans le groupe associant les myoblastes squelettiques au facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α : dans ce groupe, la fraction d'éjection s'est accrue de manière spectaculaire (27 %) par rapport aux valeurs initiales, atteignant donc un niveau bien supérieur à celui des autres groupes (respectivement P = 0,0001 et P = 0,001 par comparaison aux animaux témoins et aux animaux recevant du facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α). Comparé à l'injection isolée de myoblastes squelettiques, l'administration conjointe du facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α a entraîné une angiogenèse, une prise de greffe et une survie cellulaire significativement plus importantes.

Conclusion : L'induction de l'angiogenèse est un moyen efficace de potentialiser les bénéfices fonctionnels de la greffe de myoblastes et le facteur de transcription induit par l'hypoxie 1 α peut réussir à atteindre cet objectif.

Can bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells regenerate infarcted myocardium?

Agbulut O, Mazo M, Bressolle C, Gutierrez M, Azarnoush K, Sabbah L, Niederlander N, Abizanda G, Andreu EJ, Pelacho B, Gavira JJ, Perez-Ilzarbe M, Peyrard S, Bruneval P, Samuel JL, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Hagège AA, Prósper F, Menasché P.

Objectifs : Evaluer les effets fonctionnels des cellules progénitrices adultes multipotentes de la moelle osseuse : multipotent adult progenitor cells (MAPC) greffées chez le modèle du rat atteint d'un infarctus du myocarde chronique.

Méthodes : Quarante quatre rats ont subi une ligature des artères coronaires. 14 jours plus tard, ils ont été randomisés en deux groupes pour recevoir par injection dans la cicatrice soit (5×10^6 cellules/ 150 μ l) de cellules MAPC allogéniques transduites par la protéine fluorescente verte modifiée (eGFP) (n=25) ou un milieu de culture (témoins, n=19). Des études fonctionnelles ont été pratiquées sur neuf des cœurs traités par MAPC, et les 16 autres cœurs ont reçu des cellules marquées également avec du Resovist pour n'être utilisées que lors des évaluations histologiques des séries. La fonction ventriculaire gauche (VG) a été évaluée en aveugle, par échocardiographie avant la transplantation et 1 mois après. L'immunohistochimie, la microscopie électronique et la PCR ont servi à détecter les cellules greffées. Toutes les données ont été comparées à l'aide de tests non-paramétriques.

Résultats : Il n'y avait pas de différences significatives entre les fractions d'éjection initiales (FE, médian ; écart type) des groupes : soit respectivement 30% [0,23;0,37] et 37% [0,32;0,38] dans le groupe témoin et dans le groupe cœur transplanté par rat multipotent adult progenitor cells (rMAPC). Un mois plus tard, la fonction du VG des cœurs témoin s'était détériorée comme le montre la baisse de la FE à 24% [0,21;0,30], et bien que la FE avait tendance à être plus stable après la greffe cellulaire (37% [0,27;0,41]), la différence entre les deux groupes n'était pas statistiquement différente (p=0,06).

Bien que les MAPC étaient identifiables très tôt après leur greffe, l'immunohistochimie, le microscope électronique ou la recherche par polymérase chain reaction (PCR) n'ont pas permis de mettre en évidence la prise de la greffe un mois plus tard.

Conclusions : Malgré la détection de marqueurs endothéliaux lors de la période initiale après greffe, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différenciation en cardiomyocytes et aucune prise de greffe n'a pu être identifiée au-delà des 2 semaines qui ont suivi l'injection des cellules.

Can erythropoietin improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium?

Chanséaume S, Azarnoush K, Maurel A, Bellamy V, Peyrard S, Bruneval P, Hagège AA, Menasché P.

Objectifs : Les bénéfices de la greffe de myoblastes squelettiques sont limités par le taux élevé de mort cellulaire précoce, principalement d'origine ischémique. Nous avons donc voulu évaluer si la survie du greffon pouvait être améliorée par l'utilisation complémentaire d'érythropoïétine (EPO).

Méthodes : Les artères inter ventriculaires antérieures de trente cinq rats Lewis ont été ligaturées. Deux semaines plus tard, ils ont été randomisés pour recevoir en injection dans la cicatrice un milieu témoin, des myoblastes squelettiques (5=106) ou des myoblastes squelettiques additionnés d'EPO la veille de la greffe et poursuivi pendant deux semaines (500 U/kg trois fois par semaine). Un quatrième groupe a été traité par EPO uniquement sans injection. L'évaluation des fonctions a été réalisée par échocardiographie en 2D avant la greffe et un mois après.

Résultats : Si l'on compare les cœurs témoins et les cœurs traités à l'EPO uniquement à ceux greffés avec des myoblastes, la récupération de la fraction d'éjection du VG de ces derniers était significativement meilleure, qu'ils aient reçu de l'EPO ou non. Il n'y avait aucune différence dans la zone de greffe des myoblastes ni dans l'angiogenèse entre les groupes myoblastes uniquement et myoblastes + EPO. L'apoptose était à peine détectable, et donc inchangée par le traitement à l'EPO.

Conclusions : Dans ce modèle, l'EPO n'a pas permis d'améliorer la prise de greffe des myoblastes et la fonction du VG après infarctus. Ces découvertes négatives justifient de poursuivre la recherche de stratégies alternatives permettant d'améliorer la survie cellulaire.

Azarnoush Kasra

Thérapie cellulaire myocardique

Résumé :

Objectif : A partir d'un sujet de DEA, avec le soutien de toute l'équipe INSERM U633, élaborer une stratégie de recherche et progresser sur un thème pour permettre le développement de la thérapie cellulaire. Ce travail de recherche fondamentale permettant l'écriture et l'application d'un protocole de recherche chez l'homme.

Quatre protocoles différents ont été réalisés :

- améliorer la résistance du greffon cellulaire en appliquant un choc thermique
- améliorer la survie des myoblastes squelettiques à l'aide d'un gène de survie cellulaire
- étudier la survie et l'efficacité des cellules progénitrices adultes multipotentes dérivées de la moelle osseuse en greffon myocardique
- améliorer les résultats de la transplantation de myoblastes squelettique par l'apport d'érythropoïétine

Un PHRC Local sur la thérapie cellulaire par des cellules mononuclées médullaires autologues lors de la revascularisation myocardique a été élaboré et accepté. Actuellement un tiers de l'effectif a été inclus. Une modification des critères d'inclusion permet actuellement un recrutement plus important de patients.

Mots clés :

- Myoblastes squelettiques
- Choc thermique
- HIF-1 α
- Angiogenèse
- Cellules progénitrices adultes multipotentes
- Erythropoïétine
- Cellules mononuclées médullaires autologues
- Programme hospitalier de recherche clinique

Jury :

Président :	Monsieur le Professeur P. Menasché
Directeur :	Monsieur le Professeur C. de Riberolles
Membre :	Monsieur le Professeur C. Dubray
Membres et rapporteurs :	Monsieur le Professeur M. Laskar
	Monsieur le Professeur A. Prat

Date de la soutenance : 25 mai 2010