



HAL
open science

Évaluation des vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques humaines comme une alternative à la greffe des cellules : applications dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique

Anaïs Kervadec

► **To cite this version:**

Anaïs Kervadec. Évaluation des vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques humaines comme une alternative à la greffe des cellules : applications dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB015 . tel-02110935

HAL Id: tel-02110935

<https://theses.hal.science/tel-02110935>

Submitted on 25 Apr 2019

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.

Thèse de doctorat de l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale BIO Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie et Physiopathologie

Evaluation des vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques humaines comme une alternative à la greffe des cellules : application dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique

Par Anaïs Kervadec

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

PARCC – Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire

Equipe 6B – Thérapies régénératives des pathologies cardiaques et vasculaires - Inserm U970

Directeur de thèse : Pr Albert Hagège

Encadrement par les co-directeurs de l'équipe : Pr Philippe Menasché

Dr Jean-Sébastien Silvestre

Présentée et soutenue publiquement le 7 septembre 2017

Devant un jury composé de :

Dr Soazig Le Lay (CR)

Rapporteur

Pr André Terzic (Professeur)

Rapporteur

Dr Clotilde Théry (DR)

Examineur

Pr Jérôme Larghero (PU-PH)

Examineur

A ma Maman, Françoise,

Tu avais raison,

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps l'ensemble des membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : Dr Soazig Le Lay et Pr André Terzic en tant que rapporteurs ainsi que Dr Clotilde Théry et Pr Jérôme Larghéro en tant qu'examineurs.

Je remercie le LabEx Revive qui a financé ma thèse pendant trois ans ainsi que la Fédération Française de Cardiologie et la Fondation de France qui ont supporté financièrement ce projet.

Je remercie le Pr Albert Hagège d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Pr Philippe Menasché de m'avoir donnée l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 ainsi que ma thèse dans son équipe. Depuis le premier jour, il a cru en mes capacités et m'a toujours encouragée à aller plus haut et plus loin dans mes projets et ambitions. Sa remarquable carrière, la richesse de ses connaissances et son dynamisme m'ont toujours épatée et représentent des modèles à suivre pour ma future carrière. Sa rigueur et son exigence au travail, mais toujours rythmées avec beaucoup d'humour, d'encouragements et de soutien, ont été un équilibre parfait durant les quatre années passées à ses côtés. Tout simplement, un grand merci pour tout ce que vous m'avez apportée.

Je souhaite remercier le Dr Alain Tedgui pour ses précieux conseils et encouragements tout au long de ce parcours.

Un grand merci également à tous les membres de l'équipe du Pr Menasché. Tout d'abord, à Valérie, le véritable pilier de l'équipe. Tu m'as toujours supportée dans les bons moments comme dans les plus difficiles, nos moments sushis/terrace vont me manquer ! Nadia, ma petite boule d'énergie et pro de la crêpe, nous nous sommes bien serrées les coudes entre doctorantes. Laetitia, tu as toujours été prête à me rendre service et à m'aider. Gabriel Ifergan, tu es et resteras mon docteur préféré. Mon acolyte Emna, une très belle rencontre, mon seul regret est de ne pas t'avoir connu plus tôt. Bruna, ta bonne humeur et ta folie ont égayé mes journées et vont beaucoup me manquer. François, pour ta sympathie au quotidien. Enfin, une mention spéciale à Nisa, qui a été bien plus qu'une simple collègue de travail, je dirais même une seconde maman. Tu m'as apportée tellement de choses, à la fois professionnellement et

personnellement. Je n'oublierai jamais ta générosité, ta gentillesse, ton écoute, ton soutien, ton aide, mais aussi tes mini-bikinis, tes craquages, notre complicité, nos moments de fou-rires et j'en passe... Tu as été un guide, mais aussi une confidente, pendant ces quatre années au laboratoire. « See you next time in USA ! »

J'ai également une pensée pour les anciens étudiants ou employés du laboratoire : Amaury, Marc-Antoine, Magalie, Camille, Margaux, Léa, Jeanne, Alexandra et Marie.

Je remercie le Dr Jean-Sébastien Silvestre (ou Jean-Sé pour les intimes), co-directeur de l'équipe, pour ses précieux conseils scientifiques, sa joie de vivre et son humour ainsi que les membres de son équipe : José, Ivana, Cristina, Mathilde, Ingrid, Angélique et Swift. J'ai une pensée pour Adèle, Kiave et Anta.

Je souhaite remercier les membres du Laboratoire de Recherches Biochirurgicales de la Fondation Alain Carpentier : Mme Carpentier, Jeanne, Martine, Adrien, Julie, Nermin, Claire, Pr Chachques, Tiana et Alain Bel de m'avoir accompagnée durant toute cette période, pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur convivialité au quotidien.

Merci au Pr Patrick Bruneval et à Chantal Mandet pour leur expertise technique en histologie.

Je tiens à remercier le Pr Onnik Agbulut et son équipe de recherche avec qui nous sommes en étroite collaboration : Solenne, Camille, Yeranuhi, ainsi que Solène et Pierre qui ont quitté récemment le laboratoire.

Je témoigne toute ma reconnaissance à nos nombreux collaborateurs pour ce projet : Dr Hany Nematalla, Marie-Cécile Périer, Pr Jérôme Larghéro, Dr Valérie Vanneaux, Lousineh Arakelian, Isabelle Cacciapuoti, Florent Dumont, Dr Joanna Kowal, Dr Clotilde Théry, Dr Min Yin, Dr Xavier Loyer, Dr Chantal Boulanger, Dr Gilles Renault, Dr Thomas Viel, Dr Hadi Toeg, Ghislaine Frébourg, Dr Gareth Williams, Dr Véronique Meijborg et Nicoline Smit.

Je remercie tout le personnel de l'animalerie pour s'être occupé de nos petites souris.

Merci à l'équipe administrative pour leurs compétences et disponibilité : Annette, Véronique, Catherine, Annie et les deux Martine. Merci également à Bruno, Roland, Larby et Mario.

Je remercie également l'école doctorale de m'avoir accordée deux bourses de mobilité internationale. J'ai ainsi eu l'opportunité d'intégrer l'équipe du Pr Mark Mercola et du Dr Alexandre Colas en Californie et je les remercie également pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité, les compétences qu'ils m'ont transmise et pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre. Merci au Pr Menasché qui a accepté ces voyages.

Une pensée également à tous les autres doctorants du bâtiment. Ca y est, on y est arrivé !

Un grand merci à toute ma famille pour leur soutien et leurs encouragements et plus particulièrement à mon père, Patrick, et mes deux sœurs, Maëva et Nolwenn, même si vous pensez parfois que je suis un peu l'extra-terrestre de la famille. Mention spéciale à mon Didou.

Merci à mes « p'tites potes » Amel, Rima, Mams, Adèle, Begorre et Fof'. Vous êtes au top !

Et enfin, pour toi Steve, tu as été d'un énorme soutien et sans toi je ne serai jamais arrivée jusque là. Tu m'as toujours montrée à quel point tu es fier de moi et je suis plus que reconnaissante de tout ce que tu as fait pour moi. Tu sais déjà tout, alors je te dis tout simplement : « thank you with all my heart and see you soon ! »

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES.....	6
ABREVIATIONS.....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
TABLE DES TABLEAUX.....	16
PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION DU PROJET DE THESE.....	17
CHAPITRE 1 : L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	17
1. Epidémiologie.....	17
2. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.....	18
3. Etiologie de l'IC.....	20
4. L'infarctus du myocarde.....	22
5. Conséquences et adaptation cardiaque.....	23
6. Diagnostic.....	27
7. Les traitements actuels de l'insuffisance cardiaque.....	28
CHAPITRE 2 : LA THERAPIE CELLULAIRE.....	33
1. Définition de la thérapie cellulaire.....	33
2. Les principaux types cellulaires utilisés.....	33
3. Génération de cellules cardiaques dérivées des cellules souches pluripotentes.....	38
4. Les défis de la thérapie cellulaire.....	41
5. Les limites de la thérapie cellulaire.....	44
CHAPITRE 3 : VERS UNE THERAPIE A-CELLULAIRE.....	46
1. Description et biogenèse des vésicules extracellulaires.....	46
2. Composition des vésicules extracellulaires.....	48
3. Devenir des vésicules extracellulaires.....	52
4. Rôles des vésicules extracellulaires.....	54
5. Les vésicules extracellulaires comme agents thérapeutiques.....	58
6. Avantages d'une thérapie a-cellulaire.....	59
CHAPITRE 4 : OBJECTIFS ET PRESENTATION DU SUJET DE THESE.....	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA PREMIERE PARTIE.....	61
DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES ISSUES DE PROGENITEURS CARDIOVASCULAIRES	
SSEA-1+ DERIVES DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES.....	75
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	75

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	76
1. Culture et purification des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1 ⁺	76
2. Caractérisation des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1 ⁺	77
3. Isolation et caractérisation des vésicules extracellulaires	79
4. Mise en place du modèle animal d'insuffisance cardiaque chronique	83
5. Injections transcutanées guidées par échographie.....	88
6. Le modèle expérimental <i>in vivo</i>	90
7. Suivi des vésicules extracellulaires après injections intra-myocardiques.....	95
8. Analyse des miARNs des vésicules extracellulaires.....	97
9. Analyse statistique	99
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	101
1. Caractérisation des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1 ⁺	101
2. Caractérisation des vésicules extracellulaires.....	103
3. Etude de l'effet thérapeutique des vésicules extracellulaires <i>in vivo</i>	108
4. Suivi des vésicules extracellulaires après injections intra-myocardiques.....	119
5. Analyse des miARN des vésicules extracellulaires	121
CHAPITRE 4 : CONCLUSION.....	123
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA PREMIERE PARTIE.....	134
TROISIEME PARTIE : COMPARAISON DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DE VESICULES EXTRACELLULAIRES DERIVEES DE DEUX TYPES CELLULAIRES DIFFERENTS, CARDIOMYOCYTES ET CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES D'ORIGINE HUMAINE	139
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	139
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	140
1. Culture et caractérisation des cellules	140
2. Isolation et caractérisation des vésicules extracellulaires	141
3. Evaluation du potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires <i>in vivo</i>	142
4. Analyse statistique	143
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	144
1. Caractérisation des cellules.....	144
2. Caractérisation des vésicules extracellulaires.....	145
3. Etude de l'effet thérapeutique des différents traitements <i>in vivo</i>	146
4. Expériences complémentaires	148
CHAPITRE 4 : CONCLUSION.....	152

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA TROISIEME PARTIE	158
QUATRIEME PARTIE : EVALUATION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES ISSUES DE PROGENITEURS CARDIOVASCULAIRES DERIVES DE CELLULES SOUCHES HUMAINES INDUITES A LA PLURIPOTENCE.....	161
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	161
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	163
1. Culture et caractérisation des cellules	163
2. Isolation et caractérisation des vésicules extracellulaires	165
3. Tests fonctionnels des vésicules extracellulaires.....	165
4. Evaluation de l’effet thérapeutique des vésicules extracellulaires <i>in vivo</i>	172
5. Analyse des miARN.....	175
6. Analyse statistique	176
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	177
1. Caractérisation des Pg-iPS et CM-iPS	177
2. Caractérisation des vésicules extracellulaires <i>in vitro</i>	179
3. Evaluation de l’efficacité des vésicules extracellulaire <i>in vitro</i>	181
4. Etude de l’effet thérapeutique des vésicules extracellulaires <i>in vivo</i>	190
5. Analyse du contenu en miARN des vésicules extracellulaires	200
CHAPITRE 4 : CONCLUSION.....	204
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	207
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA QUATRIEME PARTIE	212
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	215
1. Conclusion du projet de thèse et retombées cliniques.....	215
2. Perspectives cliniques	217
3. Perspectives scientifiques	219
4. Nouveaux champs d’application	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE DE LA CONCLUSION GENERALE.....	223
CONTRIBUTION AU PROJET.....	228
PUBLICATIONS	229
VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	231

ABRÉVIATIONS

3R : Réduire, Raffiner, Remplacer
7AAD : 7-aminoactinomycin D
 α MEM : Minimum essential medium alpha
Ac : Anticorps
AC6 : Adénylyl cyclase 6
ACP : Analyse en composantes principales
AnnV : Annexine-V
ANOVA : Analysis of variance
ARF6 : ADP-Ribosylation factor 6
BMP-2 : Bone morphogenetic protein 2
BSA : Bovine serum albumin
CM : Cardiomyocyte
CMF : Cytométrie en flux
CM-iPS : Cardiomyocyte dérivé de cellule souche pluripotente induite
cryo-MET : Cryo-microscopie électronique à transmission
CS : Cellule souche
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
CSE : Cellule souche embryonnaire
CSEh : Cellule souche embryonnaire humaine
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EdU : 5-éthynyl-2'-déoxyuridine
ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport
FE : Fraction d'éjection
FGF : Fibroblast growth factor
FITC : Fluorescéine isothiocyanate
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HUVEC : Cellules endothéliales de veine ombilicale humaine
IC : Insuffisance cardiaque
ICC : Insuffisance cardiaque chronique
IDM : Infarctus du myocarde

IP : intrapéritonéale
iPS : Cellule souche pluripotente induite
iPS-CM : cardiomyocyte dérivés d'iPS
iPS-Pg : progéniteur cardiaque dérivés d'iPS
J2 : Deuxième jour de culture
J4 : Quatrième jour de culture
MC : Milieu conditionné
MCV : Maladies cardiovasculaires
microARN : miARN
MO : Moelle osseuse
NTA : Nanoparticle tracking analysis
O.C.T. : Optimal cutting temperature
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate buffer saline
PFA : Paraformaldéhyde
Pg : Progéniteur cardiovasculaire
Pg-CSEh : Progéniteur cardiovasculaire dérivé de cellule souche embryonnaire humaine
Pg-iPS : Progéniteur cardiovasculaire dérivé de cellule souche pluripotente induite
qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative
rpm : Rotation par minute
SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1
SMA : Actine α du muscle lisse
SNG : Sérum normal de chèvre
SVF : Sérum de veau fœtal
SSEA-1 : Stage-specific embryonic antigen 1
TRITC : Tétramethylrhodamine
TSG101 : Tumor susceptibility gene 101
VD : Ventricule droit
VE : Vésicules extracellulaires
VG : Ventricule gauche
VTD : Volume diastolique
VTS : Volume télésystolique
WGA : Wheat germ agglutinin

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Proportion des différentes causes de mortalité en Europe chez les hommes (A) et chez les femmes (B) selon l'Organisation Mondiale de la Santé.</i>	18
<i>Figure 2 : Principales causes de l'insuffisance cardiaque.</i>	21
<i>Figure 3 : Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires.</i>	22
<i>Figure 4 : L'infarctus du myocarde dû à l'athérosclérose.</i>	23
<i>Figure 5 : Les différentes phases du remodelage cardiaque après un IDM.</i>	26
<i>Figure 6 : Schéma représentant les différents paramètres examinés pour le diagnostic de l'IC.</i>	27
<i>Figure 7 : Les différentes sources de cellules souches utilisées dans la thérapie cellulaire cardiaque.</i>	34
<i>Figure 8 : Les différentes stratégies pour la génération de cardiomyocytes in vitro.</i>	39
<i>Figure 9 : Biogenèse des différentes sous-populations de vésicules extracellulaires.</i>	48
<i>Figure 10 : Composition des vésicules extracellulaires.</i>	49
<i>Figure 11 : les différentes sous-populations de vésicules extracellulaires et leurs interactions avec leurs cellules cibles.</i>	53
<i>Figure 12 : Schéma regroupant les différentes étapes de la culture des Pg cardiovasculaires jusqu'à l'isolation des VE.</i>	79
<i>Figure 13 : a) Appareillage NanoSight LM10. b) Principe du NanoSight basé sur la diffusion dynamique de la lumière.</i>	80
<i>Figure 14 : Principe du NanoSight pour la caractérisation des VE.</i>	81
<i>Figure 15 : a) Appareillage qNano. b) Schéma explicatif de l'analyse qNano.</i>	82
<i>Figure 16 : Photos de l'artère coronaire descendante antérieure gauche. a) passage de l'aiguille pour sa ligature. b) ligature de l'artère coronaire.</i>	87
<i>Figure 17 : a) Mise en place de la souris sur la station d'imagerie VisualSonics Vevo 770. b) Visualisation par échocardiographie d'une injection intra-myocardique dans un cœur de souris en ICC.</i>	89
<i>Figure 18 : Schéma global expérimental in vivo.</i>	91
<i>Figure 19 : Les différentes séries d'expérimentations chez la souris insuffisante cardiaque et analyses in vitro.</i>	92

Figure 20: (a) Spectre d'émission de la fluorescence normalisé du DiO, DiI, DiD et DiR lorsqu'ils sont liés à une membrane bicouche lipidique. (b) Spectre d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) du DiD. (c) Spectre d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) du DiR. 96

Figure 21 : Analyses immuno-histochimiques des Pg-CSEh immédiatement après tri magnétique (a-c) et après 48 heures de culture sur vitronectine (d-f)..... 103

Figure 22 : Spectres de la distribution de taille des VE de la série d'expérimentations 4 par analyse au NTA. a) Spectres des 5 vidéos individuelles pour chaque dilution. b) Spectres des VE moyennés à partir des 5 spectres pour chaque dilution. 104

Figure 23 : Spectres de la distribution de taille des VE de la série d'expérimentations 4. a) Analyse par NTA. b) Analyse par qNano 106

Figure 24 : Visualisation des VE des séries d'expérimentations 2c et 4 par cryo-MET..... 107

Figure 25 : Les différentes séries d'expérimentations regroupant trois séries in vivo et une série in vitro. 108

Figure 26 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh par rapport aux souris contrôles de la série d'expérimentations 1. 109

Figure 27 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine pendant 48h, les VE qui en sont dérivées et l' α MEM en tant que contrôle de la série d'expérimentations 2. 110

Figure 28 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh par rapport aux souris contrôles de la série d'expérimentations 1 et 2. 111

Figure 29 : Analyses histologiques et immuno-histochimiques des cœurs de souris traitées avec les Pg-CSEh, les VE qui en sont dérivées et l' α MEM en tant que contrôle. Chaque graphique est accompagné d'une image représentative du marquage ou de la coloration..... 112

Figure 30 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine pendant 48h, les VE qui en sont dérivées et l' α MEM en tant que contrôle de la série d'expérimentations 2. 113

Figure 31 : Représentations graphiques de l'analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cœurs de souris six semaines post-traitement en fonction de 3 composantes principales PC1, PC2 et PC3 pour chaque série d'expérimentations 114

Figure 32 : a) Représentations graphiques de l'analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cœurs de souris six semaines post-traitement en fonction de 3 composantes principales PC1, PC2 et PC3. b) Représentation graphique de l'analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cœurs de souris six semaines post-traitement corrélés à la PC1. c)

<i>Cartographie de l'expression de 927 gènes corrélés à la PCI (heatmap) des souris de la série d'expérimentations 2.</i>	116
<i>Figure 33 : Graphique en secteur représentant les fonctions biologiques pertinentes les plus enrichies prédites pour conduire à un effet bénéfique (vert) ou délétère (rouge) chez les souris traitées avec les VE par rapport aux souris contrôles.</i>	119
<i>Figure 34 : Evaluation de la fluorescence des VE marquées au DiR (a) et au DiD (b) par le Photon Imager RT.</i>	120
<i>Figure 35 : Visualisation de l'injection des VE marquées au DiD en région péri-infarctée par le Photon Imager RT.</i>	121
<i>Figure 36: Proportions des miARN contenus dans les VE issues des Pg-CSEh incorporés dans un patch de fibrine.</i>	122
<i>Figure 37 : Analyses du phénotype des CM-iPS et des CSM en fin de culture par immunohistochimie.</i>	145
<i>Figure 38 : Spectres de la distribution de taille des VE dérivées de CM-iPS (a) et de CSM (b).</i>	146
<i>Figure 39 : Récapitulatif du nombre de souris à chaque étape de l'étude expérimentale in vivo.</i>	147
<i>Figure 40 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les CM-iPS, les VE issues de CM-iPS et les VE issues de MSC par rapport aux souris contrôles et sham.</i>	148
<i>Figure 41 : Graphique représentant le nombre de particules libérées par CM-iPS ensemencés dans différentes conditions de culture et cultivés pendant trois jours.</i>	151
<i>Figure 42 : Photographies des Pg-iPS (a) à 10X et des CM-iPS (b) à 20X respectivement à leur 4^{ème} et 7^{ème} jour de culture.</i>	177
<i>Figure 43 : Analyses immuno-histochimiques des Pg-iPS et des CM-iPS en fin de culture. Echelle : 50 µm.</i>	178
<i>Figure 44 : Caractérisation des Pg-iPS et des CM-iPS par qPCR en fin de culture comparée à des CS pluripotentes iPS.</i>	179
<i>Figure 45 : Spectres de la distribution de taille de trois cultures et préparations différentes de VE dérivées de Pg-iPS analysé par NanoSight.</i>	180
<i>Figure 46 : Visualisation des VE dérivées de Pg-iPS par cryo-MET</i>	181
<i>Figure 47 : Etude de l'effet des VE sur la viabilité cellulaire.</i>	182
<i>Figure 48 : Etude de l'effet des VE sur l'angiogenèse grâce à un test de cicatrisation.</i>	183

<i>Figure 49 : Etude de l'effet des VE sur l'angiogenèse grâce à un test de formation de tubes de cellules endothéliales.</i>	184
<i>Figure 50 : Etude de l'effet sur la prolifération de CM-CSEh grâce à une réaction EdU. a) Exemple des différents marquages. b) Graphique montrant l'effet sur la prolifération des CM-CSEh en fonction de la dose de VE incubée.</i>	185
<i>Figure 51 : Etude de l'effet des VE à J2 et à J4 sur la prolifération de CM-CSEh.</i>	186
<i>Figure 52 : Etude de l'effet des VE « fraîches » et congelées sur la prolifération de CM-CSEh.</i>	187
<i>Figure 53 : Etude de l'effet des VE sur la transdifférenciation</i>	188
<i>Figure 54 : Internalisation des VE de Pg-iPS marquées à la calcéine-AM par les cellules H9c2.</i>	189
<i>Figure 55 : Internalisation des VE de Pg-iPS par les cellules H9c2 par microscopie confocale (63X).</i>	190
<i>Figure 56 : Récapitulatif du nombre d'animaux à chaque étape de l'étude.</i>	191
<i>Figure 57 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les CM-iPS, les Pg-iPS et les VE de Pg-iPS par rapport aux souris contrôles.</i>	192
<i>Figure 58 : Evolutions individuelles du VTS des souris traitées avec le PBS, les CM-iPS, les Pg-iPS et leurs VE.</i>	193
<i>Figure 59 : a) Exemple de photographie d'un cœur étalé. b) Comparaison de l'étendue de l'infarctus entre les souris traitées avec le PBS, les CM-iPS, les Pg-iPS et leurs VE par analyse macroscopique.</i>	193
<i>Figure 60 : Analyses histologiques et immuno-histochimiques des coeurs de souris traitées avec le PBS, les CM-iPS, les Pg-iPS et leurs VE.</i>	194
<i>Figure 61 : Représentation graphique des gènes différentiellement exprimés dans les cœurs de souris en fonction des différents traitements, CM-iPS, Pg-iPS et VE de Pg-iPS comparé aux gènes exprimés dans le groupe contrôle PBS.</i>	195
<i>Figure 62 : Comparaison des niveaux d'enrichissement de fonctions biologiques entre les différents groupes de traitement.</i>	197
<i>Figure 63 : Comparaison des niveaux d'enrichissement de fonctions biologiques entre les différents groupes de traitement.</i>	199
<i>Figure 64 : Analyse par bioanalyseur du contenu en miARN contenu dans les Pg-iPS et les VE de Pg-iPS</i>	200

Figure 65 : Analyse du nombre de miARN présents dans les Pg-iPS et dans les VE en fonction de leur intensité d'expression sur la puce (deux différentes représentations). 202

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : séquence des primers utilisés en qPCR.</i>	78
<i>Tableau 2 : Caractérisation des Pg-CSEh par CMF et qPCR, directement après tri magnétique et après 48 heures de culture sur vitronectine pour chaque tri réalisé pour les différentes séries d'expérimentations.</i>	102
<i>Tableau 3 : Caractéristiques des VE de la série d'expérimentations 4 évaluées par NanoSight pour chaque dilution.</i>	104
<i>Tableau 4 : Caractéristiques des VE de chaque série d'expérimentations analysées au NTA, au qNano et par test ELISA sur le marqueur de surface CD9.</i>	105
<i>Tableau 5 : Les 49 fonctions biologiques pertinentes enrichies dans le groupe de souris traitées avec les VE par rapport à la souris contrôle de la série d'expérimentations 2, ainsi que la p-value, le z-score et le nombre de gènes impliqués pour chaque fonction biologique.</i>	118
<i>Tableau 6 : Pureté et viabilité des Pg-CSEh après tri magnétique.</i>	121
<i>Tableau 7 : Viabilité des CM-iPS et des CSM en fin de culture.</i>	144
<i>Tableau 8 : Caractéristiques des VE issues de CM-iPS et de CSM pour chaque culture analysées au NanoSight.</i>	146
<i>Tableau 9 : Nombres de particules en fonction du volume de milieu conditionné ou vierge des CM-iPS obtenus par analyse au NanoSight.</i>	149
<i>Tableau 10 : Viabilité en fin de culture des cellules cultivées dans les différentes conditions testées.</i>	150
<i>Tableau 11 : Séquences des primers utilisés en qPCR dans la caractérisation des Pg-iPS et CM-iPS</i>	164
<i>Tableau 12 : Caractéristiques des VE dérivées de Pg-iPS obtenues par analyse au NanoSight.</i>	180
<i>Tableau 13 : miARN conservés à travers les espèces présents dans les VE de Pg-iPS.</i>	203

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION DU PROJET DE THÈSE

CHAPITRE 1 : L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

1. Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le monde avec 17.3 millions de décès selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour l'année 2013. Cela représente environ 31.5% de la mortalité mondiale totale (Townsend et al., 2016). La prévalence des MCV est en constante augmentation, puisqu'en 1990, elles représentaient 12.3 millions de décès correspondant à 25.9% de la mortalité mondiale totale. En Europe, malgré une baisse de la mortalité des MCV, plus de 4 millions de personnes meurent chaque année d'une MCV, représentant 45% de la mortalité globale, avec 1.4 millions mourant prématurément avant l'âge de 75 ans. Parmi les MCV, les pathologies coronaires représentent la première cause de mortalité avec 1.8 millions de décès. Le taux de mortalité est plus élevé chez les femmes que chez les hommes, avec 2.2 millions de mortalité chez les femmes contre 1.8 millions chez les hommes, représentant respectivement 49% et 40% de la mortalité globale (Figure 1).

Plus précisément, l'insuffisance cardiaque (IC) est un problème majeur de santé publique représentant environ 5% des hospitalisations aiguës et 10% des hospitalisations globales en Europe et aux Etats-Unis. L'IC touche 1 à 2% de la population adulte dans les pays développés, avec une prévalence qui augmente de 10% chez les personnes de 70 ans ou plus. Le nombre de patients présentant une IC s'accroît constamment en association avec le vieillissement de la population, l'augmentation de la prévalence des facteurs de risque comme le diabète et l'amélioration du taux de survie après un infarctus du myocarde (IDM), menant à une augmentation du nombre de patients présentant un risque de développer une dysfonction ventriculaire gauche tardive (Gilbert and Krum, 2015). En France, l'IC touche près d'1 million de personnes avec 150 000 nouveaux cas par an et représente la première cause d'hospitalisation chez l'adulte. Le pronostic reste sévère avec 50% de mortalité à 5 ans.

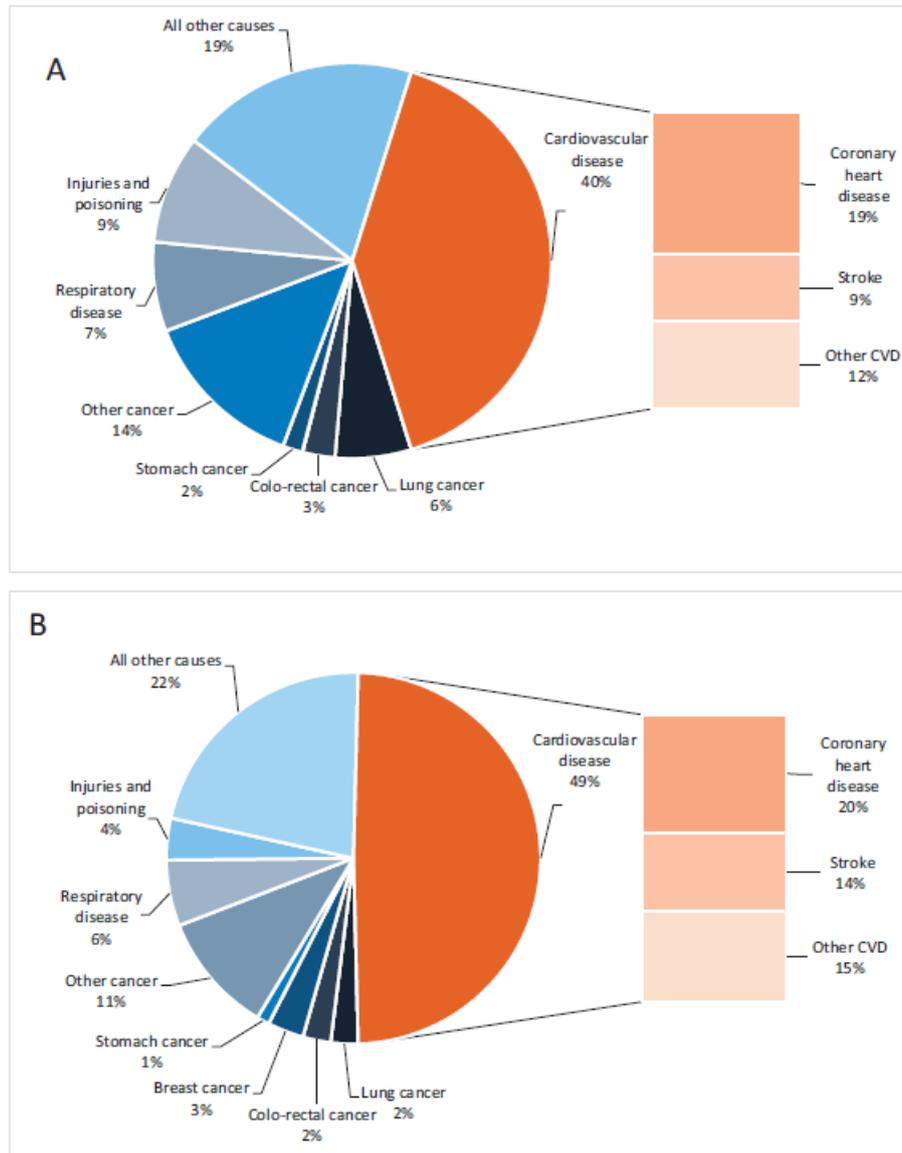


Figure 1 : Proportion des différentes causes de mortalité en Europe chez les hommes (A) et chez les femmes (B) selon l'Organisation Mondiale de la Santé.

2. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC est définie comme une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur conduisant à un apport en oxygène insuffisant pour répondre aux besoins métaboliques des différents organes. En d'autres termes, le cœur ne peut plus effectuer correctement son travail de pompe, assurant un débit sanguin diminué à travers l'organisme.

Les signes cliniques sont nombreux et sont caractérisés principalement par un essoufflement au repos ou pendant l'effort, une fatigue chronique et des signes de rétention hydrique tels que des œdèmes au niveau des membres inférieurs ou une congestion pulmonaire. Une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur peut être caractérisée par une cardiomégalie, des souffles cardiaques, une anomalie de l'électrocardiogramme et une augmentation de la concentration des peptides natriurétiques (ANP, BNP). Ces symptômes peuvent s'accompagner d'une tachycardie, d'un épanchement pleural, d'une pression veineuse jugulaire élevée ou encore d'une hépatomégalie (Dickstein et al., 2008).

On distingue l'IC droite et l'IC gauche, représentant respectivement une insuffisance ventriculaire droite ou gauche, bien que ces deux processus soient souvent liés dans une IC globale. Lorsque le ventricule droit (VD) est touché, celui-ci n'arrive plus à éjecter le sang vers les poumons ce qui provoque un essoufflement dû à leur mauvaise perfusion. A l'inverse, lorsque le ventricule gauche (VG) est touché, le sang s'accumule dans les capillaires pulmonaires, empêchant les poumons de fonctionner correctement ce qui provoque une dyspnée. Au fil du temps, les capillaires vont s'épaissir et se « muscler » pour chasser le sang ce qui va entraîner une hypertension artérielle pulmonaire. Cela va se répercuter sur le VD puisque celui-ci doit exercer une pression de plus en plus forte pour envoyer le sang dans l'artère pulmonaire, une IC droite s'installe alors. La diminution de la fonction cardiaque entraîne une diminution de la vascularisation de tous les tissus.

L'IC est classée en différents stades selon le degré de sévérité basé sur les symptômes du patient (classification fonctionnelle de New York Heart Association – NYHA) :

- Classe 1 : pas de limitation de l'activité physique. Pas de signes de fatigue, palpitations ou dyspnée.
- Classe 2 : limitation légère de l'activité physique. Confortable au repos mais signes de fatigue, de palpitations et de dyspnée lors d'un effort physique ordinaire.
- Classe 3 : limitation marquée de l'activité physique. Confortable au repos mais signes de fatigue, de palpitations et de dyspnée lors d'un effort physique faible.
- Classe 4 : Incapacité d'activité physique sans gêne. Symptômes au repos et symptômes amplifiés lors d'une activité physique.

3. Etiologie de l'IC

L'IC est la voie finale commune de nombreuses MCV comme l'hypertension artérielle, les cardiomyopathies, les cardiopathies valvulaires, les maladies du rythme cardiaque, et principalement des cardiopathies ischémiques tel l'IDM. En effet, les maladies coronaires représentent la cause initiale de l'IC dans 70% des cas, secondées par les cardiopathies valvulaires (10%) et les cardiomyopathies (10%). Il existe différentes formes de cardiomyopathies comme la cardiopathie hypertrophique, la cardiomyopathie dilatée, la cardiomyopathie restrictive et la cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène. Parmi les autres causes de l'IC, on retrouve la myocardite, une inflammation cardiaque, qui se déclenche le plus souvent à la suite d'une infection virale. Cette inflammation peut modifier la structure du cœur, le rendant moins souple et/ou dilaté. D'autres facteurs peuvent conduire à l'IC à long terme comme la consommation de drogues ou de toxine. Des mutations génétiques des protéines clés impliquées dans la contractilité des cardiomyocytes (CM) peuvent aussi entraîner une cardiomyopathie (chaîne lourde de la myosine cardiaque β , troponine T, troponine I, tropomyosine α , actine) (Seidman and Seidman, 2001). Des malformations cardiaques congénitales peuvent aussi avoir lieu lors du développement du fœtus et conduire à une IC. Les pneumopathies peuvent entraîner une IC puisqu'elles réduisent l'apport d'oxygène disponible pour l'organisme forçant le cœur à augmenter son travail pour compenser ce manque d'oxygène. Plus rarement, des pathologies endocriniennes peuvent entraîner une IC comme par exemple une hyperthyroïdie, qui se caractérise par une sécrétion excessive d'hormones augmentant l'utilisation d'énergie par le corps, ce qui se répercute aussi sur le travail cardiaque. Les pathologies rénales peuvent aussi être impliquées avec, par exemple, les phéochromocytomes qui sont des tumeurs issues des cellules chromaffines de la médullosurrénale, sécrétant des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) causant une hypertension artérielle. Des carences nutritionnelles peuvent engendrer une cachexie, c'est-à-dire un état d'affaiblissement et d'amaigrissement du corps extrême, augmentant le travail cardiaque (Figure 2). Les cardiomyopathies ne regroupent pas les canalopathies (dysfonctionnement des canaux ioniques membranaires) à l'origine de troubles du rythme cardiaque telles que le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long et les tachycardies ventriculaires catécholergiques, qui sont le plus souvent dus à des mutations génétiques.

Coronary heart disease	Many manifestations
Hypertension	Often associated with left ventricular hypertrophy and preserved ejection fraction
Cardiomyopathies*	Familial/genetic or non-familial/non-genetic (including acquired, e.g. myocarditis) Hypertrophic (HCM), dilated (DCM), restrictive (RCM), arrhythmogenic right ventricular (ARVC), unclassified
Drugs	β -Blockers, calcium antagonists, antiarrhythmics, cytotoxic agents
Toxins	Alcohol, medication, cocaine, trace elements (mercury, cobalt, arsenic)
Endocrine	Diabetes mellitus, hypo/hyperthyroidism, Cushing syndrome, adrenal insufficiency, excessive growth hormone, pheochromocytoma
Nutritional	Deficiency of thiamine, selenium, carnitine. Obesity, cachexia
Infiltrative	Sarcoidosis, amyloidosis, haemochromatosis, connective tissue disease
Others	Chagas' disease, HIV infection, peripartum cardiomyopathy, end-stage renal failure

Figure 2 : Principales causes de l'insuffisance cardiaque (par Dickstein K, Eur J Heart Fail, 2008).

Le risque de développer une MCV est augmenté lorsque le patient présente un ou plusieurs facteurs de risque. Les facteurs de risque sont classés en deux catégories : les facteurs de risque constitutionnels, ou non modifiables, et les facteurs de risque environnementaux associés à des habitudes de vie (facteurs comportementaux) ou à l'environnement (pollution, climat). Parmi les facteurs de risque constitutionnels, on retrouve l'âge, l'hérédité (antécédents familiaux de MCV) et le sexe. Les facteurs de risque environnementaux regroupent le tabagisme, une consommation excessive d'alcool, un régime alimentaire riche en acides gras saturés, l'obésité, la sédentarité, un taux de cholestérol élevé, une pression artérielle élevée, le diabète, le syndrome métabolique, les maladies rénales chroniques ou encore le stress (Figure 3). De nouveaux facteurs de risque biochimiques ont été identifiés comme un taux élevé du fibrinogène, un taux élevé de la protéine C-réactive (CRP, *C-reactive protein*), une hyperhomocystéinémie et d'autres marqueurs biochimiques comme l'interleukine 6, la leptine, l'insuline, l'adiponectine et les rénines plasmatiques. Une hygiène de vie saine permet de contrôler les facteurs de risque environnementaux et de diminuer le risque de développer une MCV. La prévention se fait de manière collective par des campagnes de lutte contre le tabagisme par exemple, mais aussi de manière individuelle en estimant le risque cardiovasculaire du patient en prenant en compte tous ses facteurs de risque afin de diminuer le risque d'accident cardiovasculaire. L'équation de Framingham est l'équation la plus utilisée pour estimer le risque coronarien et cérébro-vasculaire absolu chez un patient. Cependant, elle ne se base que sur certains facteurs de risque et reste une prédiction.

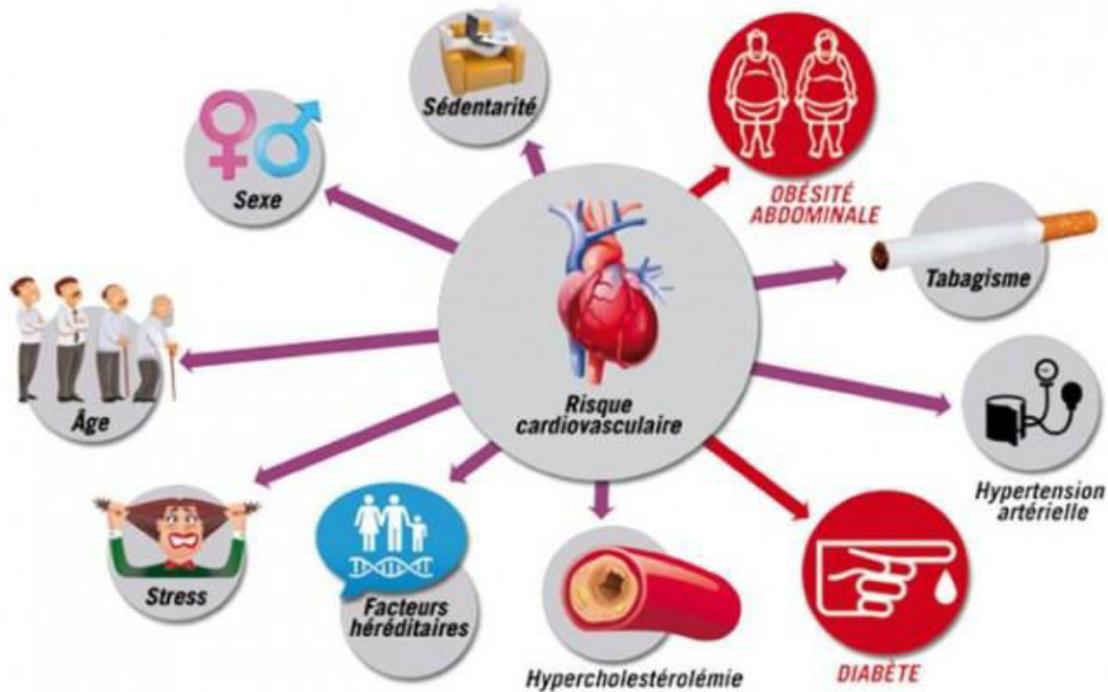


Figure 3 : Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires (par Jacob S, Diabète et Obésité n°89, 2015).

4. L'infarctus du myocarde

L'IDM fait partie des cardiopathies ischémiques qui représentent la principale cause d'IC. L'IDM est caractérisé par une perte massive de CM, due à une ischémie prolongée du tissu cardiaque, à la suite d'une thrombose occlusive brutale d'une artère coronaire. Il existe différentes causes d'occlusion vasculaire mais l'athérosclérose en est la cause principale. L'athérosclérose se caractérise par la formation d'une plaque d'athérome, composée principalement de cholestérol, à l'intérieur du vaisseau. L'évolution de la maladie est lente et comporte plusieurs stades : 1) les lipides commencent à s'accumuler dans le vaisseau formant des stries lipidiques, 2) les plaques apparaissent ensuite et se caractérisent par une chape fibreuse contenant des fibres de collagène, des cellules inflammatoires et un noyau rempli de débris cellulaires et de lipides, 3) les monocytes s'infiltrent dans la plaque et se différencient en macrophages phagocytant les lipides et entraînant une réaction inflammatoire chronique locale ce qui favorise le développement de la plaque et sa fragilisation (Figure 4). La plaque peut devenir instable à la suite d'une érosion, d'une ulcération, d'une fissuration ou d'une

rupture, provoquant ainsi l'occlusion coronaire aiguë par un thrombus. Si le caillot n'est pas rapidement retiré grâce à une procédure de revascularisation, le myocarde se nécrose dans la zone ischémique et sera rapidement remplacé par une fibrose cicatricielle. Les conséquences sont alors une perte de contractilité de la zone infarctée, empêchant le cœur d'éjecter suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme (Boudoulas et al., 2016; Thygesen et al., 2012).

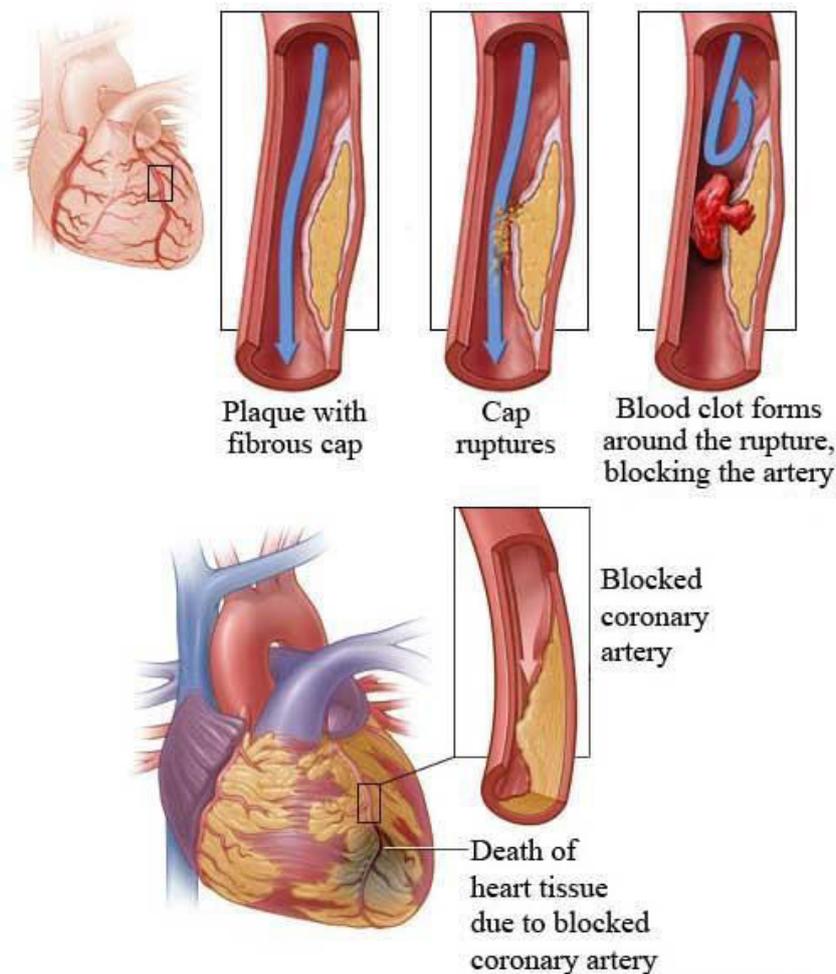


Figure 4 : L'infarctus du myocarde dû à l'athérosclérose.

5. Conséquences et adaptation cardiaque

Lors d'une IC, le cœur n'arrive plus à effectuer son travail de pompe. Il va alors s'adapter pour retrouver une fonction normale et essayer de maintenir une circulation sanguine adéquate, c'est

ce qu'on appelle le remodelage cardiaque. Le remodelage est un mécanisme complexe et dynamique allant des toutes premières minutes suivant l'occlusion coronaire jusqu'à plusieurs semaines. Il implique le réarrangement des structures cardiaques existantes. Ce réarrangement se définit par des changements moléculaires, cellulaires et interstitiels qui se manifestent par un changement de taille, de forme et de fonction du cœur (Fedak et al., 2005a; Gaertner et al., 2004). Le remodelage est dans un premier temps bénéfique car il fait intervenir des voies de transduction bénéfiques permettant au cœur de s'adapter à la situation, mais il conduit finalement à une dégradation de la fonction cardiaque et devient alors délétère.

On distingue trois phases dans le remodelage ventriculaire à la suite d'un IDM (Figure 5) :

- La phase 1 correspond à la phase aiguë. Elle survient dans les premières minutes après la survenue d'un IDM. Durant cette phase, les cellules inflammatoires (principalement les polynucléaires neutrophiles et les macrophages) pénètrent dans la zone infarctée et phagocytent les cellules nécrosées. Cette infiltration de cellules inflammatoires est possible grâce à la dégradation précoce de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases de la matrice secrétées par les fibroblastes cardiaques. La dégradation de la matrice extracellulaire entraîne un dépôt de fibrose substitutive permettant d'apporter un support structurel à la paroi. Dans un deuxième temps, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires, notamment du TNF- α , secrétées par les macrophages peuplant le tissu nécrotique (Fedak et al., 2005a). Ces myofibroblastes participent à la réparation fibrotique de la zone nécrosée et synthétisent du collagène de type I et III (Sun et al., 2000). Cette sécrétion de collagène, ajoutée à la fibrose substitutive, permet de maintenir l'intégrité structurale de la zone infarctée à la suite de la nécrose et de la détersion des myocytes (Fedak et al., 2005b). Un mois après l'IDM, les cellules inflammatoires ont disparu et la zone infarctée est totalement remplacée par les myofibroblastes. Parallèlement, la fonction contractile étant altérée par la perte de CM dans la zone ischémique, cela a pour conséquence une dilatation du VG. Cette dilatation est quasi-instantanée après la survenue d'un IDM et permet au cœur de maintenir son volume d'éjection et donc le débit cardiaque. Cette dilatation réduit la compliance myocardique et augmente les contraintes pariétales systoliques et diastoliques entraînant un étirement des tissus nécrosés et non nécrosés ce qui conduit à un amincissement de

la paroi cardiaque. Afin de retrouver une fonction contractile et empêcher une rupture de paroi du VG, les myocytes vont alors s'hypertrophier et leurs myofibrilles vont s'étirer pour améliorer la contraction cardiaque. Ainsi, les sarcomères ont besoin d'un plus faible raccourcissement pour assurer un même débit cardiaque alors que les dimensions du VG sont augmentées. La chute de la pression artérielle s'accompagne aussi d'une activation des systèmes neuro-hormonaux (catécholamines et système rénine – angiotensine – aldostérone principalement), qui a pour but de maintenir la pression artérielle à un niveau normal. Cette phase correspond à des mécanismes adaptatifs qui, s'ils ont stabilisé la fonction cardiaque, permettent d'entrer dans la deuxième phase du remodelage.

- La phase 2 correspond au remodelage compensé. Durant cette phase, le système neuro-hormonal n'est plus stimulé et les cellules inflammatoires ont disparu. Cependant, le remodelage cardiaque est toujours présent mais stabilisé. Le cœur arrive à fonctionner correctement grâce aux mécanismes adaptatifs mis en place lors de la phase 1. Il est divisé en deux parties distinctes : la fibrose cicatricielle qui permet de stabiliser et de supporter la zone infarctée et les régions non infarctées qui se sont adaptées pour retrouver un fonctionnement cardiaque normal. Malgré un retour à la normale des paramètres cardiaques, le remodelage continue et l'IC s'installe progressivement.
- La phase 3 correspond à l'IC. Lorsque le remodelage continue en augmentant la dilatation ventriculaire et lorsque la baisse de la pression artérielle persiste, l'IC devient chronique. Le remodelage n'est alors plus considéré comme bénéfique mais délétère. Les systèmes neuro-hormonaux sont de nouveau activés pour pallier cette baisse de pression artérielle et les contraintes mécaniques sont amplifiées, provoquant un remodelage exacerbé. A l'intérieur de la zone infarctée, mais aussi à distance dans le myocarde sain, le taux de cellules entrant en apoptose est augmenté et cette augmentation est fortement corrélée avec un remodelage cardiaque délétère. Bien que l'apoptose soit difficile à identifier comme une cause ou une conséquence de l'IC, elle est associée directement à la sévérité de la pathologie. L'énergie demandée au cœur devient de plus en plus forte et le cœur va de plus en plus s'affaiblir, conduisant à plus ou moins long terme au décès du patient. A noter que si les mécanismes bénéfiques mis

en place lors de la phase 1 ne réussissent pas à stabiliser la fonction cardiaque, la phase 1 est directement suivie de la phase 3.

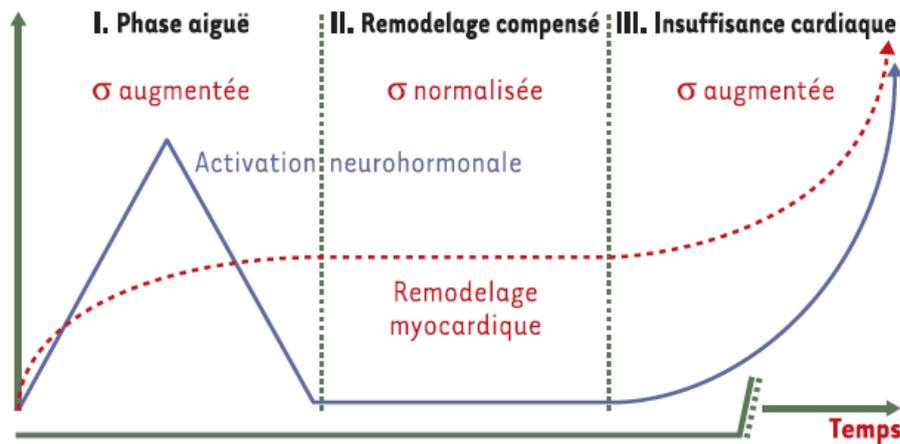


Figure 5 : Les différentes phases du remodelage cardiaque après un IDM (par Gaertner R, Med Sci, 2004).

Le remodelage cardiaque est un mécanisme puissant et peut persister même si les causes du remodelage sont réversées. Le remodelage cardiaque est d'autant plus important que la zone infarctée est étendue. Les facteurs clés du remodelage sont l'augmentation du volume du VG, la déformation du VG et le découplage ventriculo-artériel résultant de la dysfonction contractile. Ces facteurs représentent le plus fort facteur prédictif de mortalité et de morbidité au cours des années et des mois qui vont suivre la survenue de l'IDM. L'inflammation de la zone infarctée médiée par les cytokines pro-inflammatoires, avec notamment le $\text{TNF-}\alpha$, est de plus un facteur clé dans le développement des processus du remodelage cardiaque vers l'insuffisance cardiaque chronique (ICC) et représente de même un fort facteur de prédiction de mortalité à long terme des patients souffrant d'ICC (Fedak et al., 2005a). C'est pourquoi, les thérapies actuelles se focalisent sur la diminution ou l'inversion de la progression du remodelage cardiaque. Différentes stratégies sont adoptées comme la diminution de la durée et de l'étendue de l'ischémie myocardique en revascularisant la zone ischémique le plus rapidement possible, la diminution des lésions de reperfusion et la limitation de la dilatation du VG. Les cascades de signaux extra- et intracellulaires impliquées dans le remodelage cardiaque constituent des cibles thérapeutiques potentielles visant à le contrôler. Par exemple, plusieurs études *in vivo* ont montré que la prévention de l'apoptose atténue la dilatation du VG et la dysfonction cardiaque, diminuant ainsi le remodelage délétère (Li et al., 1997).

6. Diagnostic

Le diagnostic de l'IC repose sur l'observation des symptômes et les signes cliniques de la pathologie ainsi que la prise en compte des antécédents familiaux (énoncés en 1.2). Il faut savoir que le degré de sévérité de l'IC n'est pas corrélé avec les symptômes observés mais s'établit selon la classification fonctionnelle du NYHA. Outre l'examen clinique, les principales investigations comprennent une échocardiographie, un électrocardiogramme, des analyses sanguines, un examen de la fonction respiratoire, des tests d'effort afin de déterminer la condition physique du patient, une recherche d'une surcharge de liquide (œdèmes) ; le poids du patient, sa masse musculaire et son statut nutritionnel sont aussi observés (Figure 6). L'échocardiographie permet de déceler une dysfonction systolique et/ou diastolique. Cet examen est essentiel pour le diagnostic de l'IC. Les analyses sanguines comprennent une numération formule sanguine (NFS : numération des globules rouges, globules blancs et des plaquettes), un dosage des électrolytes du sérum, de la créatinine (débit de filtration glomérulaire estimé), du glucose, des enzymes du foie, un examen urinaire et un dosage des peptides natriurétiques (notamment le peptide natriurétique de type B (BNP) et le pro-BNP N-terminal (NT-proBNP)) du plasma qui sont de très bons marqueurs de l'IC.

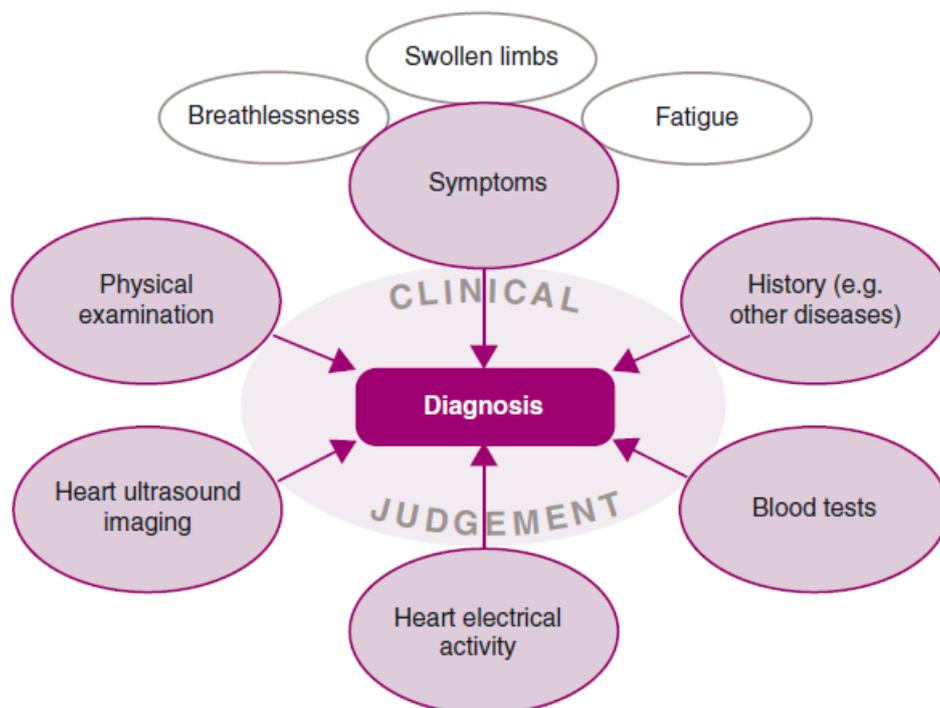


Figure 6 : Schéma représentant les différents paramètres examinés pour le diagnostic de l'IC (par Ponikowski P, ESC Heart Failure, 2014).

7. Les traitements actuels de l'insuffisance cardiaque

Les traitements de l'IC ont pour objectifs de 1) réduire la mortalité, 2) diminuer les symptômes de l'IC et améliorer la qualité de vie des patients et 3) prévenir la progression de l'IC. Un changement des habitudes du patient contre l'adoption d'un mode de vie sain doit être privilégié pour éviter à nouveau la survenue d'un événement cardiovasculaire malgré les thérapies utilisées.

a) *Les traitements pharmacologiques*

Les traitements pharmacologiques classiques pour traiter l'IC regroupent :

- Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine : ces inhibiteurs bloquent le clivage de l'angiotensine I en angiotensine II qui est un puissant vasoconstricteur. Le blocage de l'angiotensine II entraîne un relâchement des vaisseaux sanguins et donc une baisse de la pression artérielle.
- Les β -bloquants : ces molécules vont se fixer sur les récepteurs catécholinergiques, responsables de l'augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle, ce qui va bloquer leurs effets. Les β -bloquants vont ainsi diminuer la pression artérielle, réduire le rythme cardiaque et ont un effet protecteur sur le cœur contre les effets néfastes de l'activité prolongée de ces récepteurs.
- Les diurétiques : ils aident à réduire la surcharge hydrique.
- Les vasodilatateurs : ils permettent de diminuer la pression artérielle.
- Les digitaliques : ils facilitent les contractions cardiaques, réduisent la fréquence cardiaque et permettent de traiter les troubles du rythme cardiaque.
- Les anticoagulants et les antiplaquettaires : ils permettent de fluidifier le sang et préviennent les complications thromboemboliques.

Ces traitements peuvent s'accompagner d'autres médicaments aidant à prévenir les événements cardiovasculaires comme les statines qui baissent le taux de cholestérol dans le sang.

b) *Les traitements chirurgicaux et appareils d'assistance mécaniques*

Les traitements chirurgicaux comprennent :

- La revascularisation de la zone ischémique par angioplastie : un ballonnet est amené jusqu'au vaisseau obstrué grâce à un cathéter et est gonflé afin d'ouvrir l'artère et permettre la revascularisation. Un stent y est habituellement associé afin de conserver l'ouverture de l'artère.
- Le pontage coronaire : une dérivation du vaisseau obstrué est créée ce qui permet de revasculariser la zone ischémique.
- La réparation ou le remplacement des valves cardiaques.
- Le défibrillateur cardiovertible implantable (DCI) : il permet de prévenir la mort subite en délivrant un choc électrique en cas de tachycardie/fibrillation ventriculaire.
- La resynchronisation bi-ventriculaire est indiquée en cas d'asynchronisme électromécanique entre les deux ventricules qui contribue à l'IC.
- L'assistance ventriculaire gauche (AVG) : il s'agit d'une pompe implantée entre la pointe du ventricule gauche et l'aorte afin de prendre en charge la circulation sanguine. Les AVG sont implantées soit dans l'attente d'une transplantation cardiaque ou pour permettre au cœur de récupérer une fonction cardiaque normale soit de façon définitive ("destination therapy") lorsqu'il existe une contre-indication à la transplantation cardiaque.
- L'ultrafiltration : elle permet de réduire la surcharge liquidienne responsable d'œdèmes ou de congestion pulmonaire ; elle s'applique principalement pour les patients réfractaires aux diurétiques
- La transplantation cardiaque (ou greffe) : lorsque le patient ne répond plus au traitement médicamenteux et lorsque l'IC est devenue trop importante, le remplacement du cœur est alors nécessaire. Cependant, elle a comme principales limites la pénurie des greffons disponibles et les complications des traitements immuno-suppresseurs au long cours.

c) *Les traitements innovants*

Bien que nous disposions d'un panel de possibilités pour soulager les symptômes de l'IC, la meilleure thérapeutique reste à ce jour la transplantation cardiaque dans les formes les plus sévères d'IC. Cependant, les complications du traitement immunosuppresseur, la faible disponibilité des cœurs et les contre-indications à la greffe restent des limites importantes faisant envisager de nouvelles thérapeutiques. Bien que les approches thérapeutiques actuelles améliorent les symptômes de l'IC et prolongent la vie des patients, elles sont palliatives dans le sens où, à l'exception de la transplantation cardiaque, elles n'adressent pas le problème fondamental de la perte du tissu cardiaque. C'est pour cette raison que de nouvelles thérapeutiques telles que la thérapie cellulaire, la thérapie génique ou encore le développement de cœurs artificiels font l'objet d'une recherche intensive.

L'implantation d'un cœur artificiel :

Un cœur artificiel est une prothèse intracorporelle permettant de reproduire les fonctions cardiaques et ainsi d'assurer une circulation sanguine à l'ensemble de l'organisme. Les premiers cœurs artificiels développés étaient destinés aux patients en attente d'une greffe et étaient donc provisoires. La toute première greffe de cœur artificiel, appelé Jarvik-7, a eu lieu en 1982 (DeVries et al., 1984). Actuellement, le cœur artificiel SynCardia est le plus utilisé (Moore et al., 2016). Bien qu'il ait permis d'augmenter de manière considérable la survie des patients souffrant d'IC sévère, les événements thromboemboliques restent un problème majeur. Plus récemment, la société CARMAT a ainsi mis au point un nouveau cœur artificiel permettant de diminuer le risque de survenue de ces complications par l'utilisation de péricarde comme revêtement intérieur des ventricules. Ce cœur est aussi équipé de systèmes électroniques embarqués lui permettant de mieux reproduire la physiologie cardiaque ; il fait actuellement l'objet d'un essai clinique (Carpentier et al., 2015).

La thérapie génique :

Elle correspond à l'incorporation d'un gène fonctionnel à l'intérieur d'une cellule dans le but de remplacer le gène défectueux à l'origine de la maladie. Au total, cinq essais cliniques ont été publiés (Penny and Hammond, 2017) :

- Le premier essai clinique, nommé CUPID (phase II), a consisté à injecter un adénovirus recombinant encodant le gène SERCA2a par voie intra-coronaire (Jaski et al., 2009). SERCA2a est une protéine impliquée dans le maintien de la concentration cytosolique en Ca^{2+} (lequel joue un rôle majeur dans la contraction des myocytes) durant le cycle cardiaque en contrôlant son transport du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique pendant la diastole. La sous-expression de la protéine SERCA2a, observée dans l'IC, entraîne un défaut de relargage du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme par le récepteur RyR2, entraînant ainsi une relaxation prolongée du cœur. Cet essai clinique a montré une amélioration des symptômes et de la qualité de vie des patients, une amélioration de la fonction cardiaque et une réduction des événements cardiovasculaires chez les patients présentant une IC avancée, avec une bonne tolérance pour les patients.
- Dans la continuité de ces résultats encourageants, un deuxième essai clinique a été conduit, CUPID-2 (phase IIb), où les patients ont reçu à nouveau le gène SERCA2a via un adénovirus (Greenberg et al., 2014). Malheureusement, ce deuxième essai clinique est négatif et n'a donc pas confirmé les résultats encourageants de la phase I.
- Parallèlement, l'essai clinique AGENT-HF, basé sur l'administration de SERCA2a via un adénovirus par voie intra-coronaire, n'a montré aucun bénéfice fonctionnel, les résultats étant en lien avec CUPID-2 (Hulot et al., 2017).
- Un quatrième essai clinique (phase II), STOP-HF, a consisté à injecter le gène SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) via un plasmide directement dans le myocarde (Chung et al., 2015). SDF-1 (ou CXCL12) est un gène impliqué dans la réparation tissulaire en activant des mécanismes de survie cellulaire, de recrutement des cellules souches endogènes et circulantes et de vasculogénèse. Cette thérapie s'est révélée être sans danger pour les patients et efficace grâce à une atténuation du remodelage du VG et une amélioration de la performance cardiaque via une augmentation de la fraction d'éjection (FE). De plus, cet essai a montré une diminution des réadmissions hospitalières dans les 30 jours suivant la survenue de l'IDM (Pacho et al.).
- Le cinquième essai clinique a consisté à injecter le gène de l'adénylyl cyclase 6 (AC6) par voie intra-coronaire (Hammond et al., 2016). L'AC6, diminué dans l'IC, est une protéine membranaire impliquée dans le clivage de l'adénosine triphosphate en

adénosine cyclique mono-phosphate (AMPc), cette dernière étant un élément important pour la fonction cardiaque. La surexpression de l'AC6 a permis une amélioration de la fonction ventriculaire, une augmentation significative de la FE et s'est révélée être bien tolérée par les patients.

La thérapie cellulaire :

Toutes les thérapies proposées à ce jour, à l'exception de la transplantation cardiaque, ne permettent pas de repeupler la partie nécrosée du cœur. C'est pourquoi la thérapie cellulaire suscite un réel intérêt, puisqu'elle permettrait de supprimer les causes sous-jacentes de l'IC, c'est-à-dire la perte du tissu cardiaque. Le but de la thérapie cellulaire est de régénérer le cœur grâce à l'injection de nouvelles cellules dans le tissu cardiaque afin de lui redonner une fonction normale.

CHAPITRE 2 : LA THERAPIE CELLULAIRE

1. Définition de la thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire correspond à l'introduction de cellules vivantes issues du patient ou d'une source exogène directement dans la circulation sanguine ou dans un organe donné. Concernant la thérapie cellulaire cardiaque, le but serait d'injecter directement les cellules dans le tissu cardiaque. Le cœur ayant un faible potentiel de régénération endogène, la thérapie cellulaire pourrait contribuer à la régénération cardiaque par l'incorporation de cellules fonctionnelles directement dans le muscle nécrosé, l'activation de voies de réparation endogènes ou encore par le recrutement de cellules endogènes cardiaques, permettant ainsi de retrouver une fonction contractile normale. L'administration des cellules peut se faire directement par injection dans le muscle cardiaque ou peut être accompagnée d'un biomatériau pour délivrer les cellules.

2. Les principaux types cellulaires utilisés

Il faut savoir que la thérapie cellulaire cardiaque repose sur un critère important afin de se révéler efficace : le type cellulaire choisi. En effet, de nombreux types cellulaires ont déjà été testés et il s'avère que la thérapie cellulaire basée sur les cellules souches (CS) suscite un réel intérêt (Sanganalmath and Bolli, 2013). Une CS se définit comme une cellule indifférenciée ayant la capacité de se différencier en n'importe quel type cellulaire et capable de s'auto-renouveler indéfiniment. De nombreux types de CS ont déjà été testés (Figure 7).

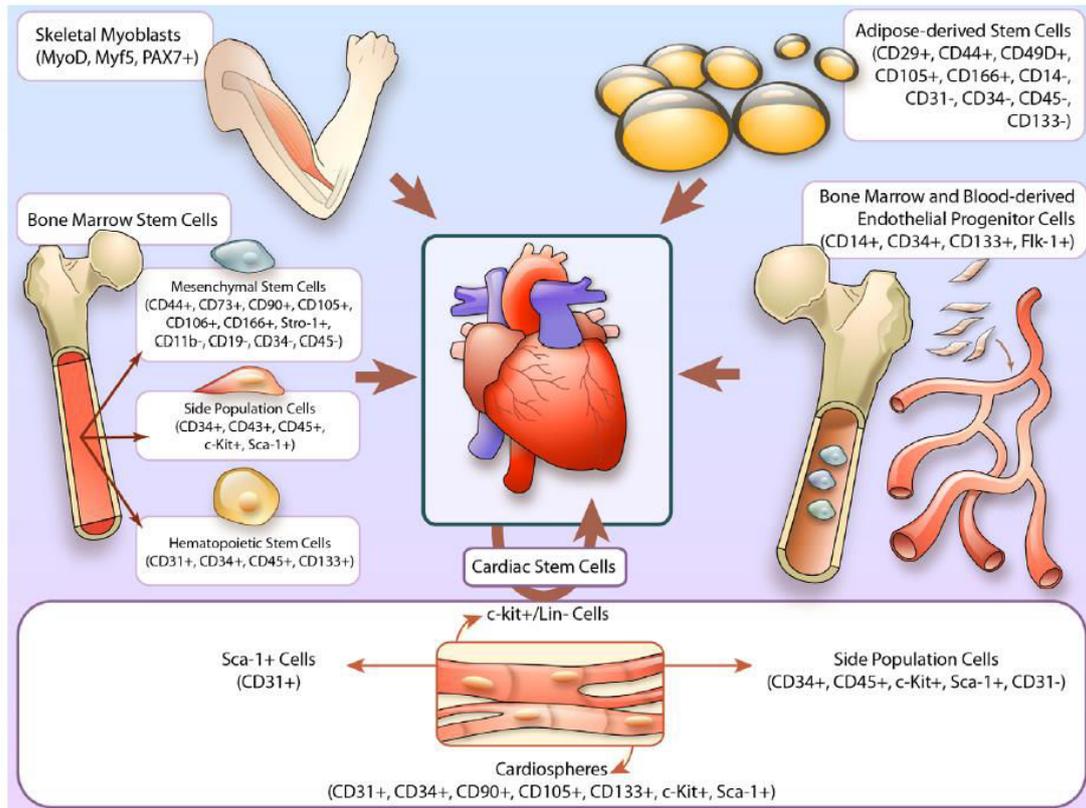


Figure 7 : Les différentes sources de cellules souches utilisées dans la thérapie cellulaire cardiaque (par Sanganalmath S, *Circ Res*, 2013).

a) Les cellules souches adultes

Les CS adultes sont des CS multipotentes, c'est-à-dire pouvant se différencier dans les différentes lignées cellulaires dérivées d'un des trois feuillets embryonnaires. Parmi les CS adultes utilisées pour la thérapie cellulaire cardiaque, on distingue :

- Les CS du muscle squelettique : appelées myoblastes, ces cellules sont responsables de la formation du muscle squelettique. Elles sont dérivées des cellules satellites présentes dans le muscle qui, lors d'une lésion musculaire, prolifèrent et stimulent la régénération en se différenciant en nouvelles fibres musculaires. Elles possèdent de nombreux avantages comme une facilité d'isolement à partir de biopsies de muscle, une expansion *in vitro* rapide et sont résistantes à des conditions ischémiques. C'est pour toutes ces raisons, qu'elles ont été les premières cellules utilisées dans la thérapie cellulaire dans des modèles animaux puis dans des essais cliniques pour traiter l'IC (Menasché et al., 2003). De nombreux essais cliniques ont ensuite émergé, rapportant des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque, une diminution du remodelage ventriculaire et une

amélioration de l'état fonctionnel des patients greffés. Malgré ces résultats encourageants, les différents essais cliniques ont montré que les myoblastes greffés provoqueraient des arythmies cardiaques du fait de leur non-implantation dans le tissu hôte. De plus, le deuxième essai clinique MAGIC (phase II), randomisé, contre placebo et en double insu, n'a pas montré d'amélioration significative de la fonction cardiaque par rapport au groupe contrôle (Menasché et al., 2008). Ensemble, ces données ont conduit à une perte de l'intérêt de ces cellules en utilisation clinique alors que d'autres types cellulaires plus prometteurs dans le traitement de l'IC ont émergé.

- Les CS de la moelle osseuse (MO) : les cellules mononucléées de la MO comprennent différentes populations de cellules telles que les cellules progénitrices endothéliales, les CS mésenchymateuses (CSM) et d'autres cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Du fait de leur facilité d'isolation et de culture, elles ont suscité un réel intérêt et ont montré des effets bénéfiques dans le traitement de pathologies cardiaques *in vivo* (Silva et al., 2011; Zhang et al., 2004). Cela a conduit à divers essais cliniques qui ont montré une amélioration significative de la fonction cardiaque, une meilleure perfusion du myocarde et une diminution des symptômes de l'IC (Beeres et al., 2007; Galiñanes et al., 2004; Perin et al., 2004, 2011). Cependant, ces résultats sont controversés puisque certains essais cliniques ont échoué à montrer un effet thérapeutique de ces cellules (Ang et al., 2008; Hendrikx et al., 2006; Perin et al., 2012). Parmi ces cellules, un grand intérêt est porté aux CSM qui sont les cellules stromales de la MO. Elles ont une grande plasticité car elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires comme des chondrocytes, des adipocytes, des ostéoblastes et des cellules du muscle squelettique. De nombreuses études ont démontré l'efficacité thérapeutique des CSM dans le traitement de l'IC et leur faible immunogénicité (Liu et al., 2008; Mazo et al., 2010; Miyahara et al., 2006; Schuleri et al., 2009; Silva et al., 2005). Cela a conduit à de très nombreux essais cliniques qui ont rapporté des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque, une amélioration de la qualité de vie des patients et une absence d'effets secondaires (Karantalis and Hare, 2015).
- Les CS dérivées des adipocytes : les CSM peuvent aussi provenir du tissu adipeux. Ces CSM peuvent se différencier en CM et cellules endothéliales et sécrètent un ensemble de facteurs angiogéniques et anti-apoptotiques ce qui leur a conféré un réel intérêt dans la thérapie cellulaire pour le traitement de l'IC. De nombreuses études *in vivo* ont

prouvé leur potentiel thérapeutique via une augmentation de l'angiogenèse, une diminution de l'apoptose, une diminution de l'inflammation, une diminution de la fibrose et une prévention du remodelage cardiaque délétère (Araña et al., 2014; Chen et al., 2014; Ishida et al., 2015). Tout comme les CSM dérivées de la MO, elles ont un faible potentiel immunogénique. Récemment, de nombreux essais cliniques ont vu le jour et ont montré une amélioration de la fonction cardiaque, une diminution de l'étendue de la fibrose cicatricielle, de la taille de l'infarctus et des symptômes de l'IC et une amélioration de la capacité physique (Chen et al., 2014). En comparaison avec les CSM issues de la MO, les CSM du tissu adipeux pourraient offrir un avantage clinique du fait de leur disponibilité (isolement par liposuction moins invasif que par ponction de la MO) et possèderaient un plus grand potentiel thérapeutique du fait de leur moindre immunogénicité et de leur plus grand potentiel angiogénique.

- Les CS cardiaques : récemment, il a été démontré que le cœur possède une population de CS résidentes capables de se différencier en CM, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et fibroblastes permettant de participer à la régénération cardiaque endogène (Leri et al., 2011). Il existe plusieurs populations de CS cardiaques comme les CS cardiaques c-kit⁺ et les cellules issues de cardiosphères (agglomérats de cellules provenant de la biopsie du ventricule droit). Le potentiel thérapeutique de ces deux types de CS cardiaques a été étudié dans de nombreuses études *in vivo* et a démontré une amélioration de la fonction cardiaque, une diminution de la taille de l'infarctus et de la fibrose et une atténuation du remodelage. Ces résultats ont conduit à l'utilisation de ces cellules en clinique. En accord avec les données obtenues dans les modèles *in vivo*, des résultats encourageants ont été obtenus avec une amélioration de la fonction cardiaque, une diminution de la fibrose et de la taille de l'infarctus et une amélioration de l'état fonctionnel des patients (Bolli et al., 2011; Malliaras et al., 2014). Cependant, les résultats sont maintenant controversés, d'autant plus que les CS cardiaques c-kit⁺ auraient plutôt tendance à se différencier vers la voie vasculaire plus que vers la voie cardiaque (van Berlo et al., 2014).

b) *Les cellules souches pluripotentes*

Il existe deux types de CS pluripotentes :

- Les CS embryonnaires (CSE) : elles proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste de 5 à 7 jours. Elles expriment des marqueurs de pluripotence tels que Nanog, Sox2 et Oct4. Du fait de leur capacité de différenciation en n'importe quel type cellulaire de l'organisme et de leur propriété de division à l'infini, elles suscitent de grands espoirs pour la thérapie cellulaire. Cependant, l'administration de CSE directement dans le cœur provoquant l'apparition de tératomes et de rejet (Nussbaum et al., 2007; Thomson et al., 1998), il est indispensable de différencier ces cellules avant de les utiliser en thérapeutique. *In vitro*, il est possible de différencier ces cellules en plusieurs types cellulaires grâce à des facteurs de croissance ou de différenciation, bien que la mise au point de ces cocktails soient complexes et longs à mettre au point. De nombreuses études ne cessent de montrer l'efficacité thérapeutique de ces cellules engagées dans la voie cardiaque (Bellamy et al., 2015; Blin et al., 2010; Ebel et al., 2007; Ménard et al., 2005). Toutefois, l'utilisation des CSE montre des limites éthiques et reste controversée malgré leur potentiel thérapeutique.
- Les CS pluripotentes induites (iPS pour *induced pluripotent stem cells*) : en 2006, Takahashi et Yamanaka ont démontré qu'il était possible de reprogrammer des cellules adultes murines en CS pluripotentes grâce à un cocktail de facteurs de différenciation bien défini (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les mêmes résultats ont été retrouvés avec les cellules humaines (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Ces cellules, nommées alors iPS, expriment les mêmes marqueurs de pluripotence que les CSE, les mêmes marqueurs de surface et possèdent des propriétés similaires. Elles ont alors suscité un grand intérêt pour la thérapie cellulaire, contournant ainsi le problème éthique associé aux CSE mais aussi pour la modélisation de pathologies (Avoir et al., 2016; Shi et al., 2017). L'objectif est de récupérer des cellules directement du patient, généralement des fibroblastes de la peau, de les reprogrammer en iPS, de les différencier en cellules cardiaques (dans le contexte de la réparation cardiaque), puis de les réinjecter au patient (greffe autologue rendant les cellules parfaitement tolérées par le patient sur le plan immunitaire) (Robinton and Daley, 2012). Cependant, l'utilisation de ces cellules génétiquement modifiées inquiète car la reprogrammation reste un processus mal contrôlé qui peut engendrer des mutations (Ben-David et al., 2010). C'est ainsi que le premier essai clinique utilisant les iPS a été suspendu au Japon à la suite de la découverte d'une mutation dans ces cellules. Aujourd'hui, les scientifiques redoublent

d'efforts pour améliorer la reprogrammation des cellules adultes et en faire un processus contrôlé et sécurisé (Takahashi and Yamanaka, 2016; Yamanaka, 2012).

Bien que de nombreux types cellulaires aient prouvé leur potentiel thérapeutique dans le traitement des pathologies cardiaques, des études de comparaison ont montré que les meilleurs résultats structuraux et fonctionnels sont observés dans les études utilisant des cellules déjà engagées vers la voie cardiaque (Menasché and Vanneaux, 2016). Le choix du type cellulaire se révèle ainsi très important et c'est ainsi que la thérapie basée sur les CS pluripotentes a montré un réel intérêt depuis ces dernières années. Etant donné le faible nombre de cellules souches cardiaques et la faible plasticité des cellules adultes, la génération de cellules cardiaques à partir de CS pluripotentes offre de nouvelles perspectives très encourageantes dans la thérapie cellulaire cardiaque. Le développement de protocoles de différenciation à partir de ces cellules indifférenciées est actuellement en pleine expansion afin de générer des Pg cardiaques ou encore des CM battants fonctionnels capables de participer à l'amélioration cardiaque une fois injectés dans le cœur.

3. Génération de cellules cardiaques dérivées des cellules souches pluripotentes

Les CS pluripotentes pouvant se différencier en n'importe quel type cellulaire et se diviser indéfiniment, elles offrent de grands espoirs dans le traitement de nombreuses pathologies et permettent de donner une nouvelle dimension à la thérapie cellulaire. Le problème d'approvisionnement de cellules utilisables en thérapie cellulaire serait en théorie supprimé, encore faut-il trouver le cocktail de molécules efficace pour différencier ces cellules vers la voie cardiaque. A l'heure actuelle, deux principaux types cellulaires sont retenus pour leur utilisation en thérapie cellulaire cardiaque, les Pg cardiaques et les CM matures, et différentes stratégies sont mises en place afin d'obtenir ces cellules *in vitro* (Figure 8).

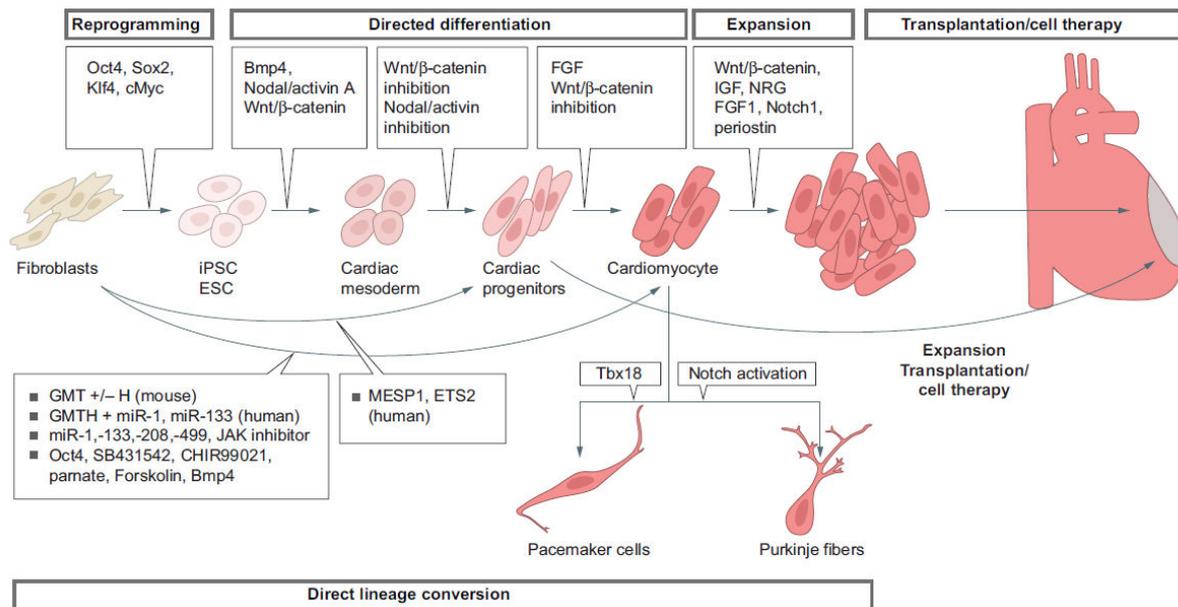


Figure 8 : Les différentes stratégies pour la génération de cardiomyocytes in vitro (par Später D, *Development*, 2014).

La génération des CM est une procédure complexe et se fait selon un protocole bien spécifique qui imite les étapes de différenciation et de développement durant l'embryogenèse. Les cellules cardiaques proviennent du mésoderme, l'un des trois feuilletés créés lors du développement précoce embryonnaire (les autres feuilletés que sont l'ectoderme et l'endoderme donnant naissance à d'autres types cellulaires de l'organisme). La spécification du mésoderme cardiaque à partir du mésoderme est contrôlée par trois grandes familles de molécules de signalisation : les protéines Wnt (*wingless integrated*), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF *fibroblast growth factor*) et plusieurs membres de la famille du facteur de croissance transformant (TGF- β , *transforming growth factor- β*) tels que Wnt3a, BMP4, Nodal et activine A. Dans un premier temps, l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est requise pour initier la formation du mésoderme pré-cardiaque. Dans un deuxième temps, cette même voie doit être inhibée afin de donner naissance aux Pg cardiaques puis aux CM battants (Später et al., 2014). En suivant cette approche, de nombreux laboratoires ont mis au point leur propre protocole permettant de générer maintenant des CM en seulement une dizaine de jours de manière efficace avec un rendement de spécification allant de 74% à 98% (Aguilar et al., 2015; Lian et al., 2012, 2013; Palpant et al., 2017). La génération de CM peut se faire via deux stratégies : la différenciation de CM à partir de la formation de corps embryoides ou à partir d'une monocouche de cellules. Il s'est avéré que cette deuxième option est la plus efficace avec

une génération de CM de plus de 30% (Lian et al., 2013). L'optimisation de ces protocoles permet de contrôler au mieux le processus de différenciation dans le but d'améliorer le rendement et la pureté des CM obtenus et c'est ainsi que Burridge a développé un protocole capable de générer des CM avec une pureté de plus de 95% grâce à une stratégie de différenciation impliquant seulement trois composants chimiquement définis : le milieu de culture RPMI 1640, l'acide ascorbique et l'albumine recombinante dérivée de riz (Burridge et al., 2014). Plus récemment, il a été démontré que la stimulation électrique peut mimer les signaux électriques endogènes présents dans les cœurs de souris prénatales et ainsi accélérer la génération des CM, et ce, sans ajouter de molécules de signalisation (Ma et al., 2017).

Dans de nombreuses études *in vivo*, l'effet thérapeutique des CM dérivés de CSE ou cellules iPS dans le cœur pour traiter l'IC a déjà été démontré (Citro et al., 2014; van Laake et al., 2007). Cependant, les CM matures ayant un potentiel de division limité, il faudrait injecter une quantité très importante de cellules afin de remplacer celles perdues lors de la nécrose. Ainsi, l'intérêt s'est porté sur les Pg cardiaques qui sont à un stade de maturation plus précoce et donc capables de se différencier en CM tout en pouvant se répliquer, ce qui en fait d'excellents candidats pour le traitement de l'IC. Ces cellules expriment les marqueurs de mésoderme cardiaque précoce tels que *Mef2c*, *Isl1*, *Nkx2.5* et *Tbx5* et n'expriment plus les marqueurs de pluripotence tels que *Oct4*, *Nanog* et *Sox2* ce qui confirme leur engagement vers la voie cardiaque. Ces marqueurs peuvent servir à isoler les Pg cardiaques. En effet, il a été démontré qu'il est possible d'isoler une population de Pg suite à l'activation de la voie Wnt puis de son inhibition suivi d'un tri magnétique dirigé contre le marqueur de surface SSEA-1 (*Stage-specific embryonic antigen 1*), autre marqueur précoce de différenciation (Blin et al., 2010). Ces cellules ont la capacité de se différencier en CM, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales, ce qui en fait plus largement des Pg cardiovasculaires et leur bénéfice fonctionnel a été démontré dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le primate. Etant donné qu'aucun protocole ne permet la différenciation des CM à 100%, un tri afin d'éliminer les cellules indifférenciées ou autres cellules n'ayant pas le bon phénotype permettrait de rendre plus efficace la thérapie cellulaire et surtout d'éliminer le risque de tératomes observés lors de l'injection de CS indifférenciées.

Parallèlement, une autre stratégie afin de générer des cellules cardiaques *in vitro* est la transdifférenciation de cellules adultes directement en Pg cardiaques ou en CM sans passer par

un stade indifférencié. A la suite d'un IDM, la fibrose remplace la perte de CM due à l'ischémie. Cette fibrose est principalement constituée de fibroblastes. L'une des stratégies pour la régénération cardiaque serait alors de transformer ces fibroblastes en CM afin de retrouver la contractilité perdue dans la zone infarctée et ainsi améliorer la fonction cardiaque. *In vitro*, la transdifférenciation de fibroblastes murins en CM a été un succès grâce à un cocktail de facteurs de transcription, Gata4, Mef2c et Tbx5 (nommé GMT), et a permis de générer jusqu'à 30% de CM (Ieda et al., 2010; Qian et al., 2012). La transdifférenciation des fibroblastes en CM s'est révélée être plus efficace lorsqu'un quatrième facteur de transcription est ajouté au cocktail précédemment identifié : Hand2 (cocktail nommé ensuite GHMT) (Song et al., 2012). Ces facteurs de transcription injectés (GMT ou GHMT) via des vecteurs dans des modèles murins d'IDM dans le myocarde péri-infarcté ont permis une amélioration de la fonction cardiaque ainsi qu'une diminution de la fibrose (Ieda et al., 2010; Inagawa et al., 2012; Song et al., 2012). Récemment, Wang et al sont arrivés à améliorer l'efficacité de reprogrammation en adaptant la stœchiométrie de GMT (Wang et al., 2015).

Bien que cette stratégie reste à optimiser, elle représente de grands espoirs thérapeutiques et possède de nombreux avantages comme 1) un faible risque de générer des tératomes puisque les cellules se différencient directement en cellules cardiaques sans passer par un stade indifférencié, 2) la facilité d'isolement des fibroblastes d'un patient qui peuvent être amplifiés *in vitro*, transdifférenciés *in vitro* puis injectés directement dans le myocarde infarcté, réduisant ainsi considérablement les risques de rejet (greffe autologue) et 3) l'injection directe de ces facteurs de transcription dans le cœur afin d'induire la transdifférenciation des fibroblastes endogènes en CM qui peuvent contribuer à une récupération fonctionnelle cardiaque.

4. Les défis de la thérapie cellulaire

Bien que le choix du type cellulaire soit une question primordiale pour le traitement de l'IC, deux autres questions importantes se posent et sont en lien avec l'efficacité de la thérapie cellulaire : le choix de la voie d'administration des cellules et la dose de cellules à injecter.

a) *Choisir la voie d'administration des cellules*

Il existe différentes voies d'administration de cellules :

- Injections systémiques : l'injection des cellules se fait directement dans la circulation sanguine par injection intraveineuse. Cette voie est peu utilisée dans la thérapie cellulaire puisqu'elle oblige les cellules à cibler le cœur de manière spécifique afin de participer à la régénération cardiaque. Une étude chez le cochon a montré que les cellules injectées sont pour la grande majorité interceptées par les poumons rendant la thérapie inefficace (Barbash et al., 2003) ;
- Injections intra-myocardiques : il s'agit de la voie d'administration des cellules la plus commune, la plus précise, la plus directe et la plus efficace dans la thérapie cellulaire cardiaque. Les injections directement dans le myocarde peuvent se faire après une thorotomie pour exposer le VG ou en même temps qu'un pontage par exemple. Une autre technique, chez l'animal, est l'injection guidée par échocardiographie où l'échocardiographie permet de visualiser la zone à injecter et permet de guider l'injection des cellules directement dans le myocarde ce qui a l'avantage d'éviter l'ouverture du thorax et donc d'être moins invasif ;
- Injections intra-coronaires : les patients ayant recours le plus souvent à une angioplastie coronaire pour revasculariser la zone ischémique, une nouvelle stratégie a été développée qui consiste à injecter les cellules par cette même voie. Cette méthode simple permet de cibler plus particulièrement la zone ischémique et de traiter les patients juste après la survenue de l'IDM, c'est-à-dire de manière précoce, ce qui pourrait améliorer les résultats bénéfiques de la thérapie. Ainsi, de nombreuses études *in vivo* chez le gros animal et essais cliniques ont adopté cette stratégie et ont démontré sa faisabilité et son efficacité (Assmus et al., 2016; Bolli et al., 2013; Mozid et al., 2014) ;
- Injections trans-endocardiques : les injections peuvent être guidées via un cathéter inséré dans l'aorte puis à l'intérieur du VG. Cette méthode est couplée à un système d'imagerie afin de localiser le mieux possible la zone d'injection tel que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'échocardiographie. De plus, elle peut être accompagnée d'un système de guidance électromécanique permettant de mesurer l'activité électrique de la zone à injecter et ainsi éviter d'injecter dans la zone fibrotique (Bartunek et al., 2013; Zheng et al., 2013). Les injections trans-endocardiques ont déjà démontré leur faisabilité et leur efficacité dans des études *in vivo* et cliniques ;

- Greffe d'un patch : depuis quelques années, un nouveau concept a émergé, celui de l'ingénierie tissulaire. Elle consiste à développer des biomatériaux pour la reconstruction des tissus ou des organes ou pour servir de vecteurs à des facteurs biologiques (gènes, cellules). A l'inverse des injections cardiaques qui ciblent uniquement quelques régions du cœur, le biomatériau greffé a l'avantage de délivrer les cellules à une plus grande partie du cœur. Les biomatériaux peuvent être synthétiques ou naturels et permettent une augmentation de la survie des cellules à l'intérieur du patch corrélée à une amélioration de la fonction cardiaque *in vivo* dans des modèles d'IC (Bellamy et al., 2015; Lancaster et al., 2016; Sugiura et al., 2016). Un essai clinique est actuellement en cours où des Pg cardiovasculaires SSEA-1+ sont incorporés dans un patch de fibrine, greffé sur le myocarde infarci de patients présentant une ICC (Menasché et al., 2015).

b) *Choisir la bonne dose de cellules à injecter*

Le deuxième aspect essentiel à prendre en compte dans la thérapie cellulaire est la dose de cellules à injecter. Les doses de cellules utilisées pour traiter l'IC dans les études *in vivo* et les essais cliniques divergent énormément entre elles. Seulement quelques études cliniques ont comparé différentes doses de cellules injectées. Dans l'essai clinique MAGIC, la plus forte dose de myoblastes injectés (8×10^6) a montré une diminution plus efficace des volumes ventriculaires et du remodelage par rapport à la plus faible dose (4×10^6), bien que ces deux doses n'aient pas amélioré la fonction cardiaque des patients greffés. L'essai clinique POSEIDON a testé 3 doses de CSM (20, 100 et 200×10^6 cellules injectées) et toutes les doses ont permis une diminution du remodelage et une amélioration de la capacité physique et de la qualité de vie des patients, bien que, de façon inattendue, la plus forte dose ait été la moins efficace (Hare et al., 2012).

La dose de cellules à injecter dépend aussi de la voie d'administration des cellules. Par exemple, la rétention des cellules injectées par voie intra-coronaire est plus faible qu'après des injections intra-myocardiques avec $2.6 \pm 0.3\%$ après injection par voie intra-coronaire contre $11 \pm 3\%$ après injection intra-myocardique (George et al., 2008; Hou et al., 2005). La voie

d'administration des cellules est donc à prendre en compte dans le choix du nombre de cellules à injecter.

La fréquence d'administration des cellules est un autre aspect à considérer dans la thérapie cellulaire. En effet, presque toutes les études *in vivo* et cliniques n'ont utilisé qu'une seule injection de cellules. Des injections répétées de cellules dans le temps pourraient améliorer l'effet de la thérapie. Plusieurs études *in vivo* supportent ce concept et ont démontré que plusieurs injections de cellules sont plus efficaces qu'une seule dose (Guo et al., 2017; Tokita et al., 2016). L'essai clinique REPEAT a démontré cette même efficacité avec une baisse de la mortalité à deux ans chez les patients recevant des injections répétées de cellules mononuclées dérivées de la MO par rapport aux patients recevant une seule dose (Assmus et al., 2016).

5. Les limites de la thérapie cellulaire

Bien que la thérapie cellulaire ait fait ses preuves quant à la récupération fonctionnelle cardiaque, plusieurs limites ont été observées. Premièrement, le choix du type cellulaire, la voie d'administration et la dose de cellules à injecter n'ont pas encore été finalisés et l'optimisation de la thérapie est toujours en cours. Deuxièmement, il a été montré que plus de 90% des cellules injectées dans le myocarde meurent au cours des premiers jours après la transplantation et ce quel que soit le type cellulaire injecté (Hong et al., 2013; Laflamme and Murry, 2005). Les cellules meurent principalement à cause de l'ischémie causée par la faible ou inexistante vascularisation dans la région injectée, l'environnement inflammatoire qui s'accompagne d'un important stress oxydatif et le relargage de cytokines cytotoxiques, la destruction immune des cellules allogéniques ou encore l'apoptose de ces cellules due à un défaut d'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire (appelée anoïkose). Bien que la grande majorité des cellules meurent, un grand nombre d'études expérimentales *in vivo* et cliniques ont démontré l'efficacité de la thérapie cellulaire. Améliorer la rétention des cellules et leur survie pourrait alors permettre d'obtenir de meilleurs résultats thérapeutiques. Aujourd'hui, des stratégies sont proposées et évaluées pour remédier à ce problème comme le prétraitement du tissu hôte avant l'administration des cellules, le prétraitement des cellules *ex vivo* par des modifications génétiques ou par pré-conditionnement physique ou pharmacologique ou encore l'implantation de biomatériaux biocompatibles contenant les cellules. Troisièmement, les mécanismes par

lesquels les cellules induisent des effets bénéfiques participant à la régénération cardiaque sont mal connus. En effet, l'observation de la mort prématurée des cellules greffées alors que les effets bénéfiques perdurent dans le temps a amené à changer notre vision de la thérapie cellulaire. Cela a mené à émettre l'hypothèse que les cellules libèreraient des facteurs paracrines qui créeraient les effets bénéfiques observés. En effet, de nombreuses études montrent que l'injection du milieu conditionné (MC) provenant de la culture de cellules thérapeutiques peut reproduire les effets bénéfiques de ces cellules (Mirotsoy et al., 2011; Timmers et al., 2007, 2011). Cette interaction paracrine entre cellules greffées et tissu hôte ne se limiterait pas à la seule sécrétion de facteurs solubles dans le milieu extracellulaire mais impliquerait les vésicules extracellulaires (VE) issues de ces cellules (Lai et al., 2010). Agissant en véritables navettes, ces VE assureraient, entre autres, le transfert de microARN (miARN) activant certaines voies-clé de signalisation (Bobis-Wozowicz et al., 2015; Chen et al., 2013; Deregibus et al., 2007; Ratajczak et al., 2006; Sahoo et al., 2011; Valadi et al., 2007; Vrijssen et al., 2010; Yuan et al., 2009) mais aussi de biolipides actifs et de fragments d'ADN susceptibles de modifier génétiquement certaines cellules du myocarde greffé, notamment les fibroblastes (Cosme et al., 2013).

CHAPITRE 3 : VERS UNE THERAPIE A-CELLULAIRE

1. Description et biogenèse des vésicules extracellulaires

Il a été démontré que tous les types cellulaires d'organismes eucaryotes et procaryotes secrètent des VE dans l'environnement extracellulaire. Chez les organismes pluricellulaires, les VE ont été retrouvées dans tous les fluides biologiques investigués tels que le sang, les urines, la salive, le lait maternel, la lymphe, les larmes, les sécrétions nasales, le liquide amniotique, le liquide céphalo-rachidien, la bile, les ascites ou encore le liquide séminal (Akers et al., 2013; Colombo et al., 2014). Les VE sont composées d'une membrane bi-lipidique similaire à la membrane cellulaire qui englobe un compartiment aqueux sans noyau. Les VE regroupent différentes sous-populations telles que les exosomes, les microparticules (MP) et les corps apoptotiques, bien que la nomenclature soit en constante évolution durant ces dernières années et reste un sujet de débat. En effet, les termes ectosome et microvésicule peuvent aussi se référer aux MP. Ces différentes sous-populations de VE se différencient par leur taille et leur biogenèse (Figure 9) :

- Les exosomes : ils sont formés dans l'endosome, un compartiment cellulaire créé par invagination de la membrane plasmique de la cellule. Durant la formation de l'endosome, dit précoce, des VE intra-luminales se forment et incorporent de manière spécifique des protéines, des lipides et le cytosol. Ce contenu est destiné à être dégradé, recyclé ou libéré par exocytose. Le contenu destiné à être recyclé sera trié dans des endosomes de recyclage. Les autres endosomes précoces deviennent des endosomes tardifs qui subissent une série de transformations et accumulent des VE intra-luminales, formant des corps multi-vésiculaires ou endosomes multi-vésiculaires. Les endosomes tardifs destinés à être dégradés vont fusionner avec les lysosomes qui contiennent des hydrolases permettant de dégrader leur contenu. D'un autre côté, des endosomes tardifs vont fusionner avec la membrane plasmique de la cellule pour libérer les VE formées dans l'espace extracellulaire. Ces VE sont appelées des exosomes et ont une taille comprise entre 30 et 100 nm. Deux processus distincts permettent la formation des vésicules intra-luminales : 1) la réorganisation des protéines de la membrane de l'endosome en micro-domaines enrichis en tétraspanines est l'une des étapes-clé dans la formation des vésicules et 2) la machinerie des protéines ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) associées aux protéines Alix et TSG101 (*Tumor*

Susceptibility Gene 101) est requise pour le bourgeonnement des vésicules dans la lumière de l'endosome. De plus, les protéines Rab sont des régulateurs essentiels impliqués dans la formation des vésicules intra-luminales et le mouvement des corps multi-vésiculaires, grâce au cytosquelette de la cellule, jusqu'à la membrane plasmique pour permettre la libération des exosomes. Les tétraspanines CD9, CD63, CD81 (*Cluster of Differentiation*) ainsi que les protéines Alix et TSG101 sont des marqueurs utilisés pour la caractérisation des exosomes.

- Les MP : contrairement aux exosomes, les MP sont formées par bourgeonnement, fission puis fusion de la membrane plasmique de la cellule et sont ainsi libérées dans le compartiment extracellulaire. Leur formation résulte d'une interaction dynamique entre la redistribution des phospholipides de la membrane cellulaire et la contraction des protéines du cytosquelette. La formation des MP est induite par une translocation de la phosphatidylsérine à la membrane externe qui est médiée par l'activité de la floppase (dont l'activité est opposée à celle de la flippase). Cette translocation entraîne un déséquilibre des lipides dans la bicouche lipidique ce qui provoque une courbure puis des bourgeonnements de la membrane à partir desquels les MP sont libérées. Un autre mécanisme a été identifié impliquant la protéine ARF6 (*ADP-Ribosylation Factor 6*) qui initie une cascade de signalisation. ARF6 active la phospholipase D, qui recrute la kinase ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) à la membrane plasmique, laquelle à son tour phosphoryle et active la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK, *Myosin Light-Chain Kinase*). Cette activation permet la contraction du cytosquelette entraînant la libération des MP. Les MP ont une taille allant de 100 à 1000 nm et la composition de leur membrane reflète celle de leur cellule mère. La phosphatidylsérine et la protéine ARF6 sont des marqueurs de ce sous-type de VE.
- Les corps apoptotiques : ils résultent, comme leur nom l'indique, de l'apoptose des cellules. Au contraire des exosomes et des MP qui sont formés lors d'un processus cellulaire normal, les corps apoptotiques ne sont formés que lorsque la cellule rentre en mort cellulaire programmée. Plusieurs étapes sont observées lors de l'apoptose d'une cellule : 1) la chromatine nucléaire se condense, 2) la membrane cellulaire forme des bourgeonnements et 3) le contenu cellulaire se désintègre en vésicules plus ou moins grosses appelées corps apoptotiques ou apoptosomes. La translocation de la phosphatidylsérine à la surface externe de la membrane est aussi un mécanisme présent

lors de la formation des corps apoptotiques. La membrane des cellules en apoptose subit des changements spécifiques dans sa composition comme l'oxydation de molécules de surface, telles que la thrombospondine et la protéine du complément C3b, qui sont reconnues par les macrophages pour phagocyter les corps apoptotiques. La phosphatidylsérine, la thrombospondine et la protéine C3b sont des marqueurs spécifiques à l'identification des corps apoptotiques. Ils ont une taille comprise entre 50 et 5000 nm.

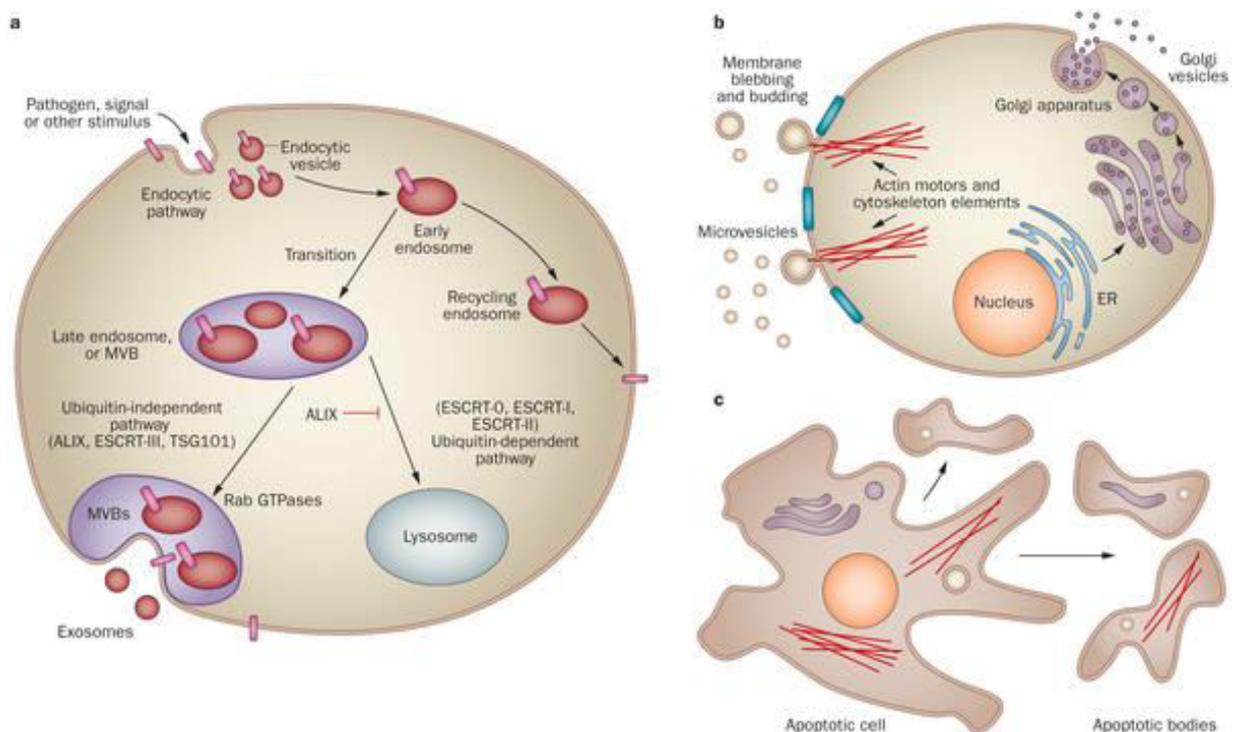


Figure 9 : Biogenèse des différentes sous-populations de vésicules extracellulaires. a) Biogenèse des exosomes. b) Biogenèse des microparticules. c) Biogenèse des corps apoptotiques (par Nawaz M, *Nature Reviews Urology*, 2014). [Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Urology*, 2014].

2. Composition des vésicules extracellulaires

L'identification du contenu des VE est une étape-clé dans leur caractérisation. Il a été montré que les VE contiennent des protéines, des lipides et des acides nucléiques tels que des ARNm, des miARN et des ARN non codants (Colombo et al., 2014) (Figure 10). Les composants des VE identifiés sont aujourd'hui répertoriés dans des bases de données telles que Vesiclepedia et EVpedia. Ainsi, 92897 protéines, 27642 ARNm, 4934 miARN et 584 lipides auraient été

identifiés dans les VE dérivées de 33 espèces différentes sur un total de 538 études selon Vesiclepedia (données de Septembre 2015). Ces données indiquent que les VE possèdent un contenu extrêmement riche de molécules et sont très hétérogènes dans leur composition.

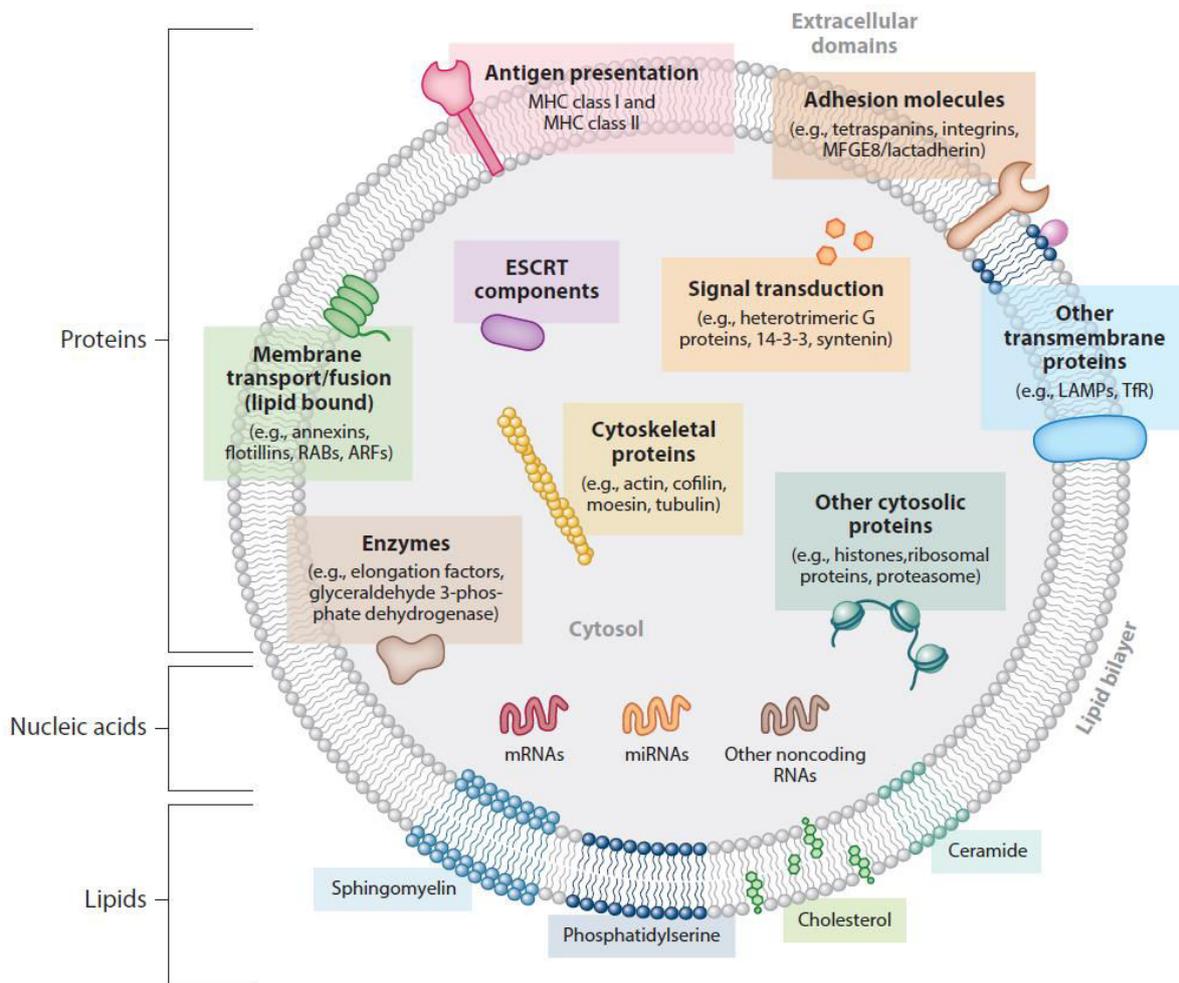


Figure 10 : Composition des vésicules extracellulaires (par Colombo M, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014).

a) Protéines

Le contenu en protéines a été investigué par plusieurs techniques : Western-Blot, microscopie immuno-électronique et plus récemment analyses protéomiques grâce à la spectrométrie de masse qui permet l'identification de toutes les protéines présentes (Raimondo et al., 2011). Ces analyses ont identifié des sous-populations de protéines conservées à travers les espèces, ce qui montre que les protéines sont empaquetées dans les VE de manière contrôlée et spécifique et non aléatoire. Parmi les protéines conservées, on retrouve des protéines impliquées dans la

structure vésiculaire et leur biogenèse telles que les tétraspanines (CD9, CD63 et CD81), des intégrines, des protéines de choc thermique (Hsp60, Hsp70 et Hsp90), les protéines de la machinerie ESCRT associées aux protéines Alix et TSG101, des annexines, des protéines du cytosquelette (actine, cofiline 1, profiline 1, tubulines, les protéines de la famille ezrine, radixine et moésine), des enzymes métaboliques, des protéines ribosomales et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Choi et al., 2013). Ces protéines ne sont pas uniformément réparties entre les différents sous-types de VE, certaines sont plus abondantes dans les exosomes et d'autres dans les MP ou les corps apoptotiques (Durcin et al., 2017; Kowal et al., 2016). Par exemple, les tétraspanines et les protéines de l'endosome seraient plus enrichies dans la fraction exosomale alors que les MP seraient plutôt enrichies en protéines ribosomales et en protéines du protéasome. Selon des études protéomiques, la composition des exosomes est différente de celle des MP (Durcin et al., 2017; Haraszti et al., 2016; Théry et al., 2009). De plus, les MP seraient plus proches de leurs cellules d'origine en termes de composition protéique que les exosomes. En effet, du fait de leur biogenèse, la membrane des MP est très proche de celle de leurs cellules mères. Les VE pourraient aussi contenir des molécules de signalisation cellulaire telles que β -caténine, Wnt5B ou le ligand de la protéine Notch, tout comme des médiateurs de voies de signalisation intercellulaires tels que l'interleukine 1- β , le TNF α ou le TGF- β (Urbanelli et al., 2013). Ces molécules pourraient directement influencer les cellules cibles des exosomes et entraîner des effets cellulaires en lien avec ces molécules. L'ensemble de ces études protéomiques ont permis d'identifier des protéines spécifiques d'un sous-type de VE alors que d'autres dépendent de la nature de la cellule d'origine. L'identification des protéines communes à un sous-type de VE pourrait permettre leur caractérisation et leur isolation spécifique afin d'étudier au mieux leur potentiel thérapeutique.

b) *Lipides*

Les lipides participent à la rigidité, à la stabilité, à la fonction et aux mécanismes de fusion intracellulaire et de bourgeonnement des VE. Les études lipodominiques ont permis d'identifier les composants lipidiques principaux des VE qui regroupent des lipides membranaires tels que la sphingomyéline, la phosphatidylcholine, la phosphatidylethanolamine, la phosphatidylsérine, le ganglioside GM3 et le phosphatidylinositol, des prostaglandines (E₂, F₂, J₂ et D₂), des céramides, le cholestérol, l'acide lysobiphosphatidique et autres acides gras

saturés (Durcin et al., 2017). Le rapport stœchiométrique de ces lipides diffère selon les sous-types de VE mais aussi selon la cellule d'origine des VE. Les exosomes seraient enrichis en ganglioside GM3 et en céramides et ces dernières seraient impliquées dans leur relargage dans le milieu extracellulaire indépendamment de la machinerie ESCRT (Trajkovic et al., 2008). L'acide lysobiphosphatidique est impliqué dans la formation des vésicules intra-luminales et serait, en revanche, absent dans les exosomes. La lysophosphatidylcholine est de même impliquée dans la formation des vésicules intra-luminales mais est aussi retrouvée dans les exosomes et représente environ 10% des phospholipides (Subra et al., 2007). Un taux plus élevé de phosphatidylsérine a été retrouvé dans les MP comparé aux exosomes, en accord avec leur biogenèse, puisque le bourgeonnement des MP résulte de la translocation de la phosphatidylsérine à la face externe de la membrane cellulaire. Les exosomes auraient ainsi une composition en lipides plus différente de leur cellule d'origine comparée aux MP. Les lipides présents peuvent s'organiser en micro-domaines enrichis en cholestérol et en sphingomyéline appelés radeaux lipidiques. Les VE peuvent contenir des lipides bioactifs pouvant induire des phénomènes biologiques. Par exemple, la sphingomyéline aurait un potentiel pro-angiogénique en stimulant la migration des cellules endothéliales, la formation de tubes vasculaires et la néovascularisation (Kim et al., 2002). De plus, l'exposition par translocation des phosphatidylsérines à la surface externe de la membrane des globules rouges, des plaquettes et des cellules endothéliales engendrerait la libération de MP ayant un effet pro-coagulant (Fu et al., 2010; Gao et al., 2012). Les prostaglandines associées à la membrane vésiculaire pourraient stimuler dans les cellules cibles des voies de signalisation intracellulaire liées à ces prostaglandines (Subra et al., 2010). De la même manière que les protéines, ces études montrent que les lipides seraient spécifiquement inclus dans les VE par un mécanisme qui n'est pas aléatoire.

c) *Acides nucléiques*

L'une des découvertes capitales dans la caractérisation des VE a été l'observation de matériel génétique tel que des ARNm et des miARN à l'intérieur des exosomes sécrétés par les mastocytes (Valadi et al., 2007). Cette étude fut la première à démontrer la communication intercellulaire par transfert de matériel génétique médié par les exosomes. Ce matériel génétique transféré peut être fonctionnel dans la cellule cible et induire un effet cellulaire ou une reprogrammation épigénétique, processus qui a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Bobis-

Wozowicz et al., 2015; Deregibus et al., 2007; Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007). Les miARN présents dans les VE peuvent être délivrés à la cellule cible et atteindre leurs ARNm cibles, induisant ainsi une régulation de l'expression des gènes (Cantaluppi et al., 2012; Valadi et al., 2007; Yuan et al., 2009). Les VE serviraient de navettes pour le transport et le transfert de molécules jusqu'à la cellule cible de façon plus efficace que la seule transfection d'ARN (Deregibus et al., 2007) car les VE protégeraient les ARN de l'activité des RNases présents dans l'environnement extracellulaire. Bien que les mécanismes par lesquels les ARN sont empaquetés dans les VE soient difficiles à déterminer, des études ont montré que certains miARN sont spécifiquement incorporés dans les VE alors que d'autres restent dans leur cellule mère (Ogawa et al., 2013). Cette incorporation des miARN dans les VE serait sous le contrôle de la ribonucléoprotéine nucléaire A2B1 (hnRNPA2B1) (Villarroya-Beltri et al., 2013). Le type cellulaire pourrait spécifier le contenu en ARN à empaqueter dans les VE comme le suggère l'observation que les VE de CSEh sont enrichies en ARNm de facteurs de transcription pluripotents tels que NANOG, OCT4, GATA2 (Ratajczak et al., 2006). Les VE pourraient ainsi conserver une signature génétique de leur cellule d'origine. D'autres études, avec notamment des analyses transcriptomiques à haut débit, ont montré que les VE peuvent aussi contenir des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert, des ARN interférants, de l'ADN mitochondrial, des ARN longs non-codants et même, plus récemment, de l'ADN génomique double brin (Kalluri and LeBleu, 2017; Ogawa et al., 2013; Wahlgren et al., 2012; Yoon et al., 2014).

3. Devenir des vésicules extracellulaires

Au fil des années, de plus en plus d'études confortent l'idée que les VE jouent un rôle important dans la signalisation paracrine, en étant capables de transporter des macromolécules à des cellules cibles, qui les reconnaissent et les internalisent grâce à leurs marqueurs de surface (Bobrie et al., 2011). Elles peuvent atteindre des cibles plus ou moins proches, en vectorisant leur contenu dans des cellules avoisinantes ou en voyageant dans la circulation sanguine pour atteindre des cellules plus lointaines. Les VE peuvent interagir avec leurs cellules cibles grâce à des mécanismes différents qui dépendent du type de la cellule cible (Figure 11) :

- Par interaction directe : deux options se présentent 1) les protéines de surface des VE sont reconnues par les cellules cibles et une liaison ligand – récepteur induit une cascade de signalisation à l'intérieur de la cellule cible pouvant induire une réponse cellulaire

sans internalisation de la VE et 2) les protéases extracellulaires clivent les protéines membranaires des VE qui peuvent alors atteindre les récepteurs des cellules cibles et induire une réponse cellulaire. Plusieurs protéines ont été identifiées permettant l'interaction directe des VE avec leurs cellules cibles telles que des molécules d'adhésion intercellulaires ICAM1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), les intégrines α_v (CD51) et β_3 (CD61), des protéines de choc thermique avec le récepteur CD91, les tétraspanines CD9 et CD81 (spécifiques aux exosomes) et la phosphatidylsérine des MP reconnue par le récepteur TIM-4 de la cellule cible (Urbanelli et al., 2013).

- Par endocytose : les VE sont reconnues par leurs protéines de surface et sont internalisées par la cellule cible via endocytose ou phagocytose. Elles sont ensuite dégradées ce qui rend leurs biomolécules accessibles pour la cellule. Ce mécanisme dépend des capacités de phagocytose de la cellule.
- Par fusion des membranes extracellulaires : la membrane vésiculaire et la membrane cellulaire fusionnent ce qui entraîne une libération du contenu de la VE à l'intérieur de la cellule cible. La fusion des membranes requiert une certaine compatibilité et une même fluidité des deux membranes. Le pH est un élément important pour ce mécanisme puisqu'un pH neutre rendrait la membrane rigide et moins apte à fusionner avec une VE alors qu'un pH de 5 est considéré comme un bon environnement permettant la fusion des deux membranes.

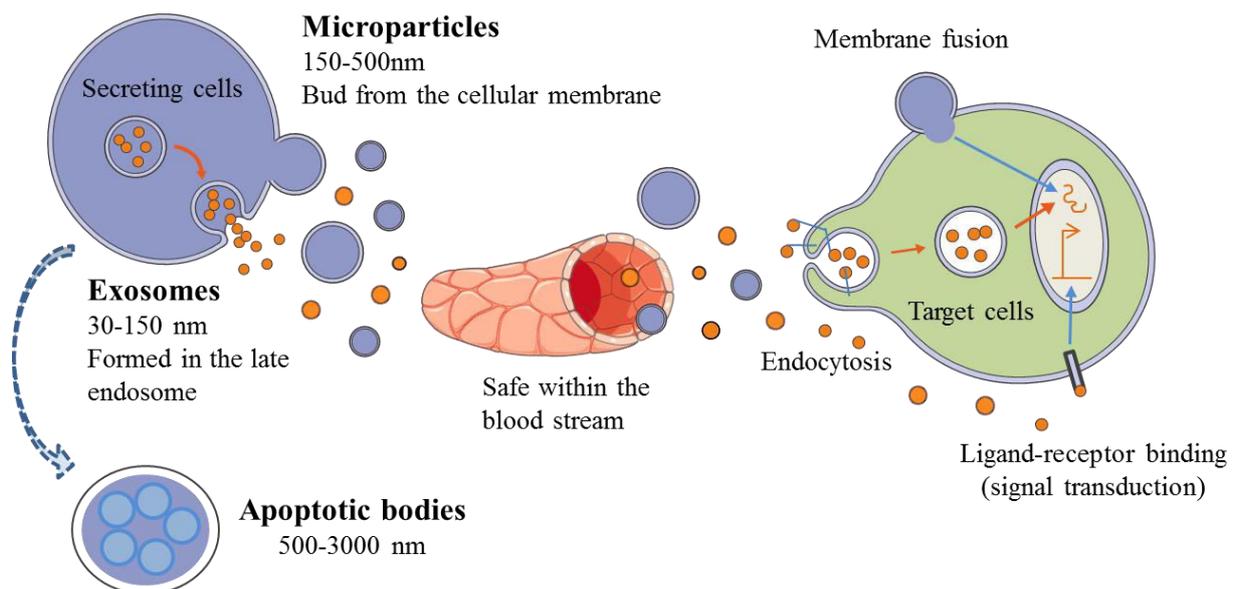


Figure 11 : les différentes sous-populations de vésicules extracellulaires et leurs interactions avec leurs cellules cibles.

Les VE cibleraient probablement leurs cellules cibles grâce à leurs récepteurs membranaires tout comme les cellules interagiraient préférentiellement avec les VE possédant les ligands complémentaires à leurs récepteurs de surface, ce qui montre une biodistribution des VE au sein de l'organisme hétérogène en fonction de la nature des VE et des tissus.

4. Rôles des vésicules extracellulaires

Initialement, les VE étaient considérées comme les déchets d'une cellule relargués dans le milieu extracellulaire. Au fil du temps, les scientifiques sont parvenus à caractériser ces VE et à leur attribuer un rôle important dans la communication intercellulaire. De nombreuses études ont montré que les VE sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, physiologiques comme pathologiques, en transportant un contenu riche en molécules et en les transférant à des cellules cibles.

a) *Rôles physiologiques*

Rôle vasculaire :

Le terme « exosome » a vu le jour en 1987 lors de l'étude de la maturation du réticulocyte en érythrocyte (Johnstone et al., 1987). Durant leur maturation, les réticulocytes subissent un certain nombre de changements incluant la perte de certains composants de la membrane plasmique via la formation et la libération d'exosomes.

L'un des mécanismes les mieux décrits dans les rôles des VE est leur participation dans l'hémostase. Les VE auraient à la fois des propriétés pro-coagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques. Les MP dérivées de différentes sources cellulaires telles que les globules rouges, les plaquettes et les cellules endothéliales auraient un rôle pro-coagulant (Fu et al., 2010; Gao et al., 2012). De plus, les VE peuvent transporter le facteur tissulaire, protéine considérée comme l'élément déclencheur de la cascade de coagulation, et ainsi renforcer la coagulation (Davila et al., 2014). Dans certains cas tels que les cancers, les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires ou encore les infections, les monocytes et les plaquettes sont sur-activés provoquant une activation des cellules endothéliales et une augmentation des VE pro-coagulantes circulantes pouvant déclencher la survenue

d'événements thrombotiques. De manière opposée, les VE peuvent transporter l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI, *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) et ainsi inhiber ou réduire l'efficacité de la coagulation (Steppich et al., 2005). L'hémostase et la coagulation sont des mécanismes qui dépendent de la qualité et de la quantité des VE circulantes.

Les VE dérivées de certains types cellulaires (leucocytes, plaquettes, cellules sanguines mononuclées) peuvent aussi avoir un rôle pro-angiogénique. Dans des conditions de stress, les cellules endothéliales peuvent influencer le contenu en protéines et en ARNm de leurs VE qui peuvent à leur tour stimuler la croissance vasculaire (de Jong et al., 2012). De plus, les VE produites par différents types cellulaires dans des conditions hypoxiques stimulent l'angiogenèse en augmentant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Huang and Feng, 2017; Ohyashiki et al., 2016; Salomon et al., 2013).

Rôle dans le développement embryonnaire :

L'un des processus centraux dans le développement embryonnaire est la coordination du positionnement des cellules dans l'embryon et la différenciation des cellules en tissus embryonnaires en réponse à un gradient de morphogènes. Les VE, et en particulier les exosomes, pourraient être impliquées dans ce phénomène en transportant des protéines telles que Wnt et Hedgehog, protéines régulant la croissance et la différenciation des cellules au cours du développement embryonnaire (Gradilla et al., 2014; McGough and Vincent, 2016). Les VE joueraient aussi un rôle dans la régulation de la polarité cellulaire durant l'embryogenèse, processus qui serait impliqué dans la différenciation des cellules en tissus spécifiques (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008).

Rôle dans l'immunité :

Les VE auraient un rôle dans la réponse immunitaire de l'organisme. Elles seraient considérées comme les messagers du système immunitaire inné et auraient donc un rôle pro-inflammatoire lors d'infections, de maladies inflammatoires chroniques, de l'athérosclérose ou encore lors de maladies auto-immunes (Boilard et al., 2010; Hoyer et al., 2012; Wang et al., 2011). Toutefois, elles peuvent aussi contribuer à une régulation négative de l'inflammation en induisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β (Gasser and Schifferli, 2004). Les

VE libérées par les différentes cellules du système immunitaire (monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes NK, mastocytes) induiraient des effets contraires selon les facteurs environnementaux et l'activation de ces cellules. Les VE joueraient aussi un rôle dans la transition de la réponse immunitaire innée à acquise en activant les cellules présentatrices d'antigènes via les antigènes qu'elles transportent. Les VE capturées par ces cellules peuvent stimuler ces cellules ou au contraire réguler négativement leur activation. Le rôle des VE dans le système immunitaire est difficile à établir du fait de leur implication à la fois dans des mécanismes pro- et anti-inflammatoires.

Autres rôles :

Les VE jouent aussi un rôle dans de nombreux processus physiologiques tels que dans l'homéostasie du foie, le développement du système nerveux, la réparation tissulaire, la calcification des os, la fécondation, la grossesse, (Yáñez-Mó et al., 2015). Pour tous ces mécanismes, les VE ont un rôle commun qui est celui de la communication intercellulaire.

b) Rôles pathologiques

VE et thrombus :

Les VE auraient des propriétés calcifiantes et seraient impliquées dans la calcification du collagène vasculaire. Ainsi, elles initieraient la formation de micro-calcifications pouvant provoquer une instabilité de la plaque, entraîner une rupture de celle-ci et conduire à l'IDM ou à l'accident vasculaire cérébral (Hutcheson et al., 2014). De plus, comme énoncé précédemment, les VE sécrétées par les plaquettes peuvent activer l'endothélium, qui active à son tour les plaquettes qui viennent adhérer à l'endothélium et contribuent à la formation d'un thrombus. De la même manière, il a été démontré qu'un taux élevé de VE dérivées des cellules endothéliales est corrélé à une augmentation de la survenue des événements cardiovasculaires (Jung et al., 2009). Les VE pourraient aussi être utilisées en tant que biomarqueurs comme, par exemple, dans l'athérosclérose (Amabile et al., 2014; Leroyer et al., 2007; Loyer et al., 2014; Yin et al., 2015).

VE et cancer :

L'implication des VE a été démontrée dans la progression de nombreux types de cancers. Les VE libérées par les cellules cancéreuses expriment les antigènes spécifiques des cellules cancéreuses à leur surface. Elles peuvent ainsi stimuler les cellules cancéreuses elles-mêmes et augmenter leur prolifération et leur migration vers un autre tissu, transférer leur potentiel oncogénique à des cellules avoisinantes qui vont à leur tour devenir cancéreuses ou même être transportées dans la circulation sanguine et initier le développement de métastases dans des organes éloignés de la tumeur initiale (Colombo et al., 2014). L'un des mécanismes associés à la tumeur est le recrutement des fibroblastes par les cellules cancéreuses (appelé fibroblastes associés au cancer). Les fibroblastes deviennent alors des myofibroblastes qui permettent de consolider la tumeur, de stimuler l'angiogenèse afin de créer un réseau vasculaire pour la tumeur et de créer un remodelage extracellulaire via la libération de facteurs de croissance pro-angiogéniques et de protéines de la matrice extracellulaire. Il a été démontré que les VE des cellules cancéreuses peuvent être impliquées dans ce phénomène en recrutant les fibroblastes et en stimulant leur différenciation en myofibroblastes (Webber et al., 2010). Les VE peuvent contenir des ARN, et plus particulièrement des miARN spécifiques des cellules cancéreuses, qui peuvent être utilisés comme des biomarqueurs dans l'identification d'un type de cancer (Hsu et al., 2017; Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Actuellement, des essais sont en cours afin d'évaluer les VE en tant que biomarqueurs prédictifs de cancer grâce à leur signature en miARN (Dejima et al., 2017; Machida et al., 2016).

VE et maladies neurodégénératives :

Les VE participeraient à la formation d'agrégats de protéines à l'origine de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (protéines β -amyloïdes formant des plaques séniles et Tau provoquant des enchevêtrements neurofibrillaires), la maladie de Parkinson (protéine α -synucléine formant les corps de Lewy), la sclérose latérale amyotrophique (protéines TDP-43 et superoxyde dismutase), la maladie de Huntington (protéine huntingtine enrichie en polyglutamine) et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (protéine prion) (Iraci et al., 2016).

5. Les vésicules extracellulaires comme agents thérapeutiques

Ces dernières années, les études sur les VE se sont multipliées ce qui a permis de mettre en évidence leur rôle de messagers dans la communication intercellulaire. Comme énoncé précédemment, les VE peuvent initier ou participer à la progression d'une pathologie. Des stratégies d'inhibition des VE sont ainsi développées et ont montré une diminution de la progression de la maladie causée, notamment des cancers (Marleau et al., 2012). A l'opposé, et notamment dans le cas de la thérapie cellulaire, il a été observé que les cellules greffées meurent prématurément dans le tissu hôte alors que les effets fonctionnels persistent. Cette constatation a bousculé les dogmes de la thérapie cellulaire, c'est-à-dire que les cellules greffées ne repeuplèrent pas le tissu lésé mais libéreraient des signaux capables de stimuler des voies de réparation endogènes, ces signaux étant les VE. En effet, les VE dérivées de cellules thérapeutiques seraient comme une réplique de leurs cellules mères et contiendraient les biomolécules actives (ARN, miARN, protéines, lipides) responsables de leurs effets bénéfiques.

Sur le plan thérapeutique, il a été récemment démontré que les VE peuvent améliorer des dommages ischémiques dans plusieurs tissus, y compris le cœur (Akyurekli et al., 2015; Barile et al., 2014). Certaines VE thérapeutiques semblent pouvoir réduire la taille de l'infarctus, l'apoptose et la masse cicatricielle et, par ailleurs, promouvoir la prolifération de CM, l'angiogenèse, et une augmentation de la fonction contractile (Arslan et al., 2013; Barile et al., 2014; Chen et al., 2013; Gallet et al., 2017; Ibrahim et al., 2014; Sahoo and Losordo, 2014). Il faut noter que, les VE secrétées par certains types cellulaires, par exemple les fibroblastes, n'apportent pas un bénéfice fonctionnel au cœur infarci, ce qui démontre que la nature de la cellule sécrétrice est primordiale dans le potentiel thérapeutique de ces VE (Barile et al., 2014). C'est pourquoi, l'ensemble des études ayant montré des effets bénéfiques sur le cœur ont utilisé les VE dérivées de types cellulaires déjà testés dans le traitement de l'IC tels que des CSM, des CM, des cellules hématopoïétiques, des Pg cardiaques ou des cellules souches cardiaques. Aujourd'hui, le passage d'une thérapie cellulaire à une thérapie a-cellulaire en utilisant uniquement les VE dérivées des cellules thérapeutiques est privilégié, ce qui justifie l'exploration fonctionnelle des VE dans le traitement de l'IC.

6. Avantages d'une thérapie a-cellulaire

Les VE offrent de nombreux avantages puisqu'elles ont un potentiel immunogène limité par rapport à leurs cellules d'origine, elles peuvent protéger leur contenu des enzymes de dégradation extracellulaires, elles sont stables dans les liquides biologiques de l'organisme et elles ont la capacité de délivrer leur contenu à des cellules cibles spécifiques grâce à leurs marqueurs de surface. Ainsi, la substitution à une greffe de cellules de la seule administration des VE qui en sont dérivées aurait une réelle pertinence clinique en permettant d'éliminer les conflits immunologiques inhérents aux greffes allogéniques, de standardiser la production des lots thérapeutiques et ainsi d'être plus reproductible et contrôlable, de réduire les coûts, de simplifier la démarche réglementaire et de faciliter la diffusion clinique de la méthode en passant à plus grande échelle. De plus, une thérapie a-cellulaire serait plus sécurisée que la thérapie cellulaire conventionnelle dans le sens où les VE de CSE ne provoquent pas de tératomes ce qui peut être le cas lors de l'injection inopportune de CSE ne s'étant pas différenciées (Khan et al., 2015).

CHAPITRE 4 : OBJECTIFS ET PRESENTATION DU SUJET DE THESE

Une étude récente menée au laboratoire a démontré que des Pg cardiovasculaires SSEA-1+ dérivées de CSEh, incorporés dans un patch de fibrine greffé sur le myocarde péri-infarci chez le rat en ICC, sont retrouvés uniquement trois jours après la greffe du patch alors que le bénéfice fonctionnel perdure dans le temps pendant quatre mois (Bellamy et al., 2015). Cette observation a mené à émettre l'hypothèse que les cellules libèreraient des facteurs paracrines qui créeraient les effets bénéfiques observés. Cette hypothèse est supportée par de nombreux travaux ayant mis en évidence l'implication de ces facteurs, et notamment des VE, dans les mécanismes de régénération cardiaque. C'est à partir de ces observations que mon projet de thèse a pris naissance.

Mon projet de thèse s'articule autour de trois grands objectifs :

1. Le premier a été de comparer l'efficacité thérapeutique des Pg cardiovasculaires SSEA-1+ dérivés de CSEh avec les VE qui en sont dérivées. Les VE ont d'abord été caractérisées *in vitro* puis l'efficacité thérapeutique a été évaluée dans un modèle murin d'ICC.
2. Afin de déterminer la meilleure source cellulaire pour la production de VE efficaces dans le traitement de l'ICC, l'effet de VE issues de CM dérivés d'iPS et de CSM a été comparé dans le même modèle animal d'ICC.
3. Retenant l'hypothèse que les VE peuvent récapituler les effets bénéfiques de leurs cellules mères et afin d'évaluer une source alternative de cellules souches pluripotentes, le troisième objectif a été de comparer l'efficacité thérapeutique de VE issues de Pg dérivés d'iPS. Les VE ont été caractérisées puis leur capacité thérapeutique a été étudiée grâce à des tests fonctionnels *in vitro* afin d'explorer les mécanismes par lesquels elles participent à la réparation cardiaque. Leurs effets thérapeutiques ont enfin été étudiés dans le même modèle animal d'ICC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA PREMIERE PARTIE

- Aguilar, J.S., Begum, A.N., Alvarez, J., Zhang, X., Hong, Y., and Hao, J. (2015). Directed cardiomyogenesis of human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin and BMP signalling with small molecules. *Biochem. J.* *469*, 235–241.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* *113*, 1–11.
- Akyurekli, C., Le, Y., Richardson, R.B., Fergusson, D., Tay, J., and Allan, D.S. (2015). A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev.* *11*, 150–160.
- Amabile, N., Cheng, S., Renard, J.M., Larson, M.G., Ghorbani, A., McCabe, E., Griffin, G., Guerin, C., Ho, J.E., Shaw, S.Y., et al. (2014). Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur. Heart J.* *35*, 2972–2979.
- Ang, K.-L., Chin, D., Leyva, F., Foley, P., Kubal, C., Chalil, S., Srinivasan, L., Bernhardt, L., Stevens, S., Shenje, L.T., et al. (2008). Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* *5*, 663–670.
- Araña, M., Gavira, J.J., Peña, E., González, A., Abizanda, G., Cilla, M., Pérez, M.M., Albiasu, E., Aguado, N., Casado, M., et al. (2014). Epicardial delivery of collagen patches with adipose-derived stem cells in rat and minipig models of chronic myocardial infarction. *Biomaterials* *35*, 143–151.
- Arslan, F., Lai, R.C., Smeets, M.B., Akeroyd, L., Choo, A., Agnor, E.N.E., Timmers, L., van Rijen, H.V., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., et al. (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* *10*, 301–312.
- Assmus, B., Alakmeh, S., De Rosa, S., Böning, H., Hermann, E., Levy, W.C., Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. (2016). Improved outcome with repeated intracoronary injection of bone marrow-derived cells within a registry: rationale for the randomized outcome trial REPEAT. *Eur. Heart J.* *37*, 1659–1666.
- Avior, Y., Sagi, I., and Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 170–182.
- Barbash, I.M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M.S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, L., Guetta, E., Zipori, D., Kedes, L.H., et al. (2003). Systemic Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Myocardium. *Circulation* *108*, 863–868.
- Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac

progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *103*, 530–541.

Bartunek, J., Behfar, A., Dolatabadi, D., Vanderheyden, M., Ostojic, M., Dens, J., El Nakadi, B., Banovic, M., Beleslin, B., Vrolix, M., et al. (2013). Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J. Am. Coll. Cardiol.* *61*, 2329–2338.

Beeres, S.L.M.A., Bax, J.J., Dibbets-Schneider, P., Stokkel, M.P.M., Fibbe, W.E., van der Wall, E.E., Schalij, M.J., and Atsma, D.E. (2007). Intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with chronic myocardial infarction and severe left ventricular dysfunction. *Am. J. Cardiol.* *100*, 1094–1098.

Bellamy, V., Vanneaux, V., Bel, A., Nemetalla, H., Emmanuelle Boitard, S., Farouz, Y., Joanne, P., Perier, M.-C., Robidel, E., Mandet, C., et al. (2015). Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *34*, 1198–1207.

Ben-David, U., Benvenisty, N., and Mayshar, Y. (2010). Genetic instability in human induced pluripotent stem cells: classification of causes and possible safeguards. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 4603–4604.

van Berlo, J.H., Kanisicak, O., Maillet, M., Vagnozzi, R.J., Karch, J., Lin, S.-C.J., Middleton, R.C., Marbán, E., and Molkenin, J.D. (2014). c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* *509*, 337–341.

Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B., Bellamy, V., Rücker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A., et al. (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* *120*, 1125–1139.

Bobis-Wozowicz, S., Kmiotek, K., Sekula, M., Kedracka-Krok, S., Kamycka, E., Adamiak, M., Jankowska, U., Madetko-Talowska, A., Sarna, M., Bik-Multanowski, M., et al. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 2748–2761.

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph. Den.* *12*, 1659–1668.

Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F.M., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., et al. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* *327*, 580–583.

Bolli, R., Chugh, A.R., D'Amario, D., Loughran, J.H., Stoddard, M.F., Ikram, S., Beache, G.M., Wagner, S.G., Leri, A., Hosoda, T., et al. (2011). Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 1847–1857.

- Bolli, R., Tang, X.-L., Sanganalmath, S.K., Rimoldi, O., Mosna, F., Abdel-Latif, A., Jneid, H., Rota, M., Leri, A., and Kajstura, J. (2013). Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* *128*, 122–131.
- Boudoulas, K.D., Triposciadis, F., Geleris, P., and Boudoulas, H. (2016). Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* *58*, 676–692.
- Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., et al. (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* *11*, 855–860.
- Cantaluppi, V., Gatti, S., Medica, D., Figliolini, F., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Biancone, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* *82*, 412–427.
- Carpentier, A., Latrémouille, C., Cholley, B., Smadja, D.M., Roussel, J.-C., Boissier, E., Trochu, J.-N., Gueffet, J.-P., Treillot, M., Bizouarn, P., et al. (2015). First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *The Lancet* *386*, 1556–1563.
- Chen, L., Wang, Y., Pan, Y., Zhang, L., Shen, C., Qin, G., Ashraf, M., Weintraub, N., Ma, G., and Tang, Y. (2013). Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *431*, 566–571.
- Chen, L., Qin, F., Ge, M., Shu, Q., and Xu, J. (2014). Application of Adipose-Derived Stem Cells in Heart Disease. *J Cardiovasc. Transl. Res.* *7*, 651–663.
- Choi, D.-S., Kim, D.-K., Kim, Y.-K., and Gho, Y.S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* *13*, 1554–1571.
- Chung, E.S., Miller, L., Patel, A.N., Anderson, R.D., Mendelsohn, F.O., Traverse, J., Silver, K.H., Shin, J., Ewald, G., Farr, M.J., et al. (2015). Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial. *Eur. Heart J.* *36*, 2228–2238.
- Citro, L., Naidu, S., Hassan, F., Kuppusamy, M.L., Kuppusamy, P., Angelos, M.G., and Khan, M. (2014). Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PloS One* *9*, e116281.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 255–289.
- Cosme, J., Liu, P.P., and Gramolini, A.O. (2013). The cardiovascular exosome: current perspectives and potential. *Proteomics* *13*, 1654–1659.

- Davila, M., Robles-Carrillo, L., Unruh, D., Huo, Q., Gardiner, C., Sargent, I.L., Adam, M., Woodhams, B.J., Francis, J.L., Bogdanov, V.Y., et al. (2014). Microparticle association and heterogeneity of tumor-derived tissue factor in plasma: is it important for coagulation activation? *J. Thromb. Haemost. JTH* *12*, 186–196.
- Dejima, H., Iinuma, H., Kanaoka, R., Matsutani, N., and Kawamura, M. (2017). Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* *13*, 1256–1263.
- Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., and Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* *110*, 2440–2448.
- DeVries, W.C., Anderson, J.L., Joyce, L.D., Anderson, F.L., Hammond, E.H., Jarvik, R.K., and Kolff, W.J. (1984). Clinical use of the total artificial heart. *N. Engl. J. Med.* *310*, 273–278.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J.J.V., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P.A., Strömberg, A., van Veldhuisen, D.J., Atar, D., Hoes, A.W., et al. (2008). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur. J. Heart Fail.* *10*, 933–989.
- Durcin, M., Fleury, A., Taillebois, E., Hilairret, G., Krupova, Z., Henry, C., Truchet, S., Trötz Müller, M., Köfeler, H., Mabilletau, G., et al. (2017). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* *6*, 1305677.
- Ebelt, H., Jungblut, M., Zhang, Y., Kubin, T., Kostin, S., Technau, A., Oustanina, S., Niebrügge, S., Lehmann, J., Werdan, K., et al. (2007). Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 236–244.
- Fedak, P.W.M., Verma, S., Weisel, R.D., and Li, R.-K. (2005a). Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *14*, 1–11.
- Fedak, P.W.M., Verma, S., Weisel, R.D., and Li, R.-K. (2005b). Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *14*, 49–60.
- Fu, Y., Zhou, J., Li, H., Cao, F., Su, Y., Fan, S., Li, Y., Wang, S., Li, L., Gilbert, G.E., et al. (2010). Daunorubicin induces procoagulant activity of cultured endothelial cells through phosphatidylserine exposure and microparticles release. *Thromb. Haemost.* *104*, 1235–1241.
- Gaertner, R., Logeart, D., Michel, J.-B., and Mercadier, J.-J. (2004). [Early left ventricular remodelling following acute coronary accident]. *Med. Sci. MS* *20*, 643–650.

- Galiñanes, M., Loubani, M., Davies, J., Chin, D., Pasi, J., and Bell, P.R. (2004). Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant.* *13*, 7–13.
- Gallet, R., Dawkins, J., Valle, J., Simsolo, E., de Couto, G., Middleton, R., Tseliou, E., Luthringer, D., Kreke, M., Smith, R.R., et al. (2017). Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur. Heart J.* *38*, 201–211.
- Gao, C., Xie, R., Yu, C., Wang, Q., Shi, F., Yao, C., Xie, R., Zhou, J., Gilbert, G.E., and Shi, J. (2012). Procoagulant activity of erythrocytes and platelets through phosphatidylserine exposure and microparticles release in patients with nephrotic syndrome. *Thromb. Haemost.* *107*, 681–689.
- Gasser, O., and Schifferli, J.A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* *104*, 2543–2548.
- George, J.C., Goldberg, J., Joseph, M., Abdulhameed, N., Crist, J., Das, H., and Pompili, V.J. (2008). Transvenous intramyocardial cellular delivery increases retention in comparison to intracoronary delivery in a porcine model of acute myocardial infarction. *J. Intervent. Cardiol.* *21*, 424–431.
- Gilbert, R.E., and Krum, H. (2015). Heart failure in diabetes: effects of anti-hyperglycaemic drug therapy. *Lancet Lond. Engl.* *385*, 2107–2117.
- Gradilla, A.-C., González, E., Seijo, I., Andrés, G., Bischoff, M., González-Mendez, L., Sánchez, V., Callejo, A., Ibáñez, C., Guerra, M., et al. (2014). Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nat. Commun.* *5*, 5649.
- Greenberg, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Butler, J., Felker, G.M., Voors, A.A., Rudy, J.J., Wagner, K., and Hajjar, R.J. (2014). Design of a phase 2b trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with advanced heart failure: the CUPID 2 trial (calcium up-regulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease phase 2b). *JACC Heart Fail.* *2*, 84–92.
- Guo, Y., Wysoczynski, M., Nong, Y., Tomlin, A., Zhu, X., Gumpert, A.M., Nasr, M., Muthusamy, S., Li, H., Book, M., et al. (2017). Repeated doses of cardiac mesenchymal cells are therapeutically superior to a single dose in mice with old myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* *112*, 18.
- Hammond, H.K., Penny, W.F., Traverse, J.H., Henry, T.D., Watkins, M.W., Yancy, C.W., Sweis, R.N., Adler, E.D., Patel, A.N., Murray, D.R., et al. (2016). Intracoronary Gene Transfer of Adenylyl Cyclase 6 in Patients With Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* *1*, 163–171.
- Haraszti, R.A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S.A., Rockwell, H.E., Gao, F., Narain, N.R., DiFiglia, M., Kiebish, M.A., et al. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* *5*.

- Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D.L., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P.V., Brinker, J.A., et al. (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308, 2369–2379.
- Hendrikx, M., Hensen, K., Clijsters, C., Jongen, H., Koninckx, R., Bijmens, E., Ingels, M., Jacobs, A., Geukens, R., Dendale, P., et al. (2006). Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation* 114, 1101-107.
- Hong, K.U., Li, Q.-H., Guo, Y., Patton, N.S., Moktar, A., Bhatnagar, A., and Bolli, R. (2013). A highly sensitive and accurate method to quantify absolute numbers of c-kit⁺ cardiac stem cells following transplantation in mice. *Basic Res. Cardiol.* 108, 346.
- Hou, D., Youssef, E.A.-S., Brinton, T.J., Zhang, P., Rogers, P., Price, E.T., Yeung, A.C., Johnstone, B.H., Yock, P.G., and March, K.L. (2005). Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112, 1150-156.
- Hoyer, F.F., Giesen, M.K., Nunes França, C., Lütjohann, D., Nickenig, G., and Werner, N. (2012). Monocytic microparticles promote atherogenesis by modulating inflammatory cells in mice. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 2777–2788.
- Hsu, Y.-L., Hung, J.-Y., Chang, W.-A., Lin, Y.-S., Pan, Y.-C., Tsai, P.-H., Wu, C.-Y., and Kuo, P.-L. (2017). Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*.
- Huang, Z., and Feng, Y. (2017). Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced β -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncol. Res.* 25, 651–661.
- Hulot, J.-S., Salem, J.-E., Redheuil, A., Collet, J.-P., Varnous, S., Jourdain, P., Logeart, D., Gandjbakhch, E., Bernard, C., Hatem, S.N., et al. (2017). Effect of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a on ventricular remodelling in patients with advanced systolic heart failure: results from the AGENT-HF randomized phase 2 trial. *Eur. J. Heart Fail.*
- Hutcheson, J.D., Goettsch, C., Pham, T., Iwashita, M., Aikawa, M., Singh, S.A., and Aikawa, E. (2014). Enrichment of calcifying extracellular vesicles using density-based ultracentrifugation protocol. *J. Extracell. Vesicles* 3, 25129.
- Ibrahim, A.G.-E., Cheng, K., and Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* 2, 606–619.
- Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G., and Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142, 375–386.

- Inagawa, K., Miyamoto, K., Yamakawa, H., Muraoka, N., Sadahiro, T., Umei, T., Wada, R., Katsumata, Y., Kaneda, R., Nakade, K., et al. (2012). Induction of Cardiomyocyte-Like Cells in Infarct Hearts by Gene Transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5 Novelty and Significance. *Circ. Res.* *111*, 1147–1156.
- Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B., and Pluchino, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 171.
- Ishida, O., Hagino, I., Nagaya, N., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y., Mori, H., and Yagihara, T. (2015). Adipose-derived stem cell sheet transplantation therapy in a porcine model of chronic heart failure. *Transl. Res.* *165*, 631–639.
- Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., Hajjar, R.J., et al. (2009). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J. Card. Fail.* *15*, 171–181.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* *262*, 9412–9420.
- de Jong, O.G., Verhaar, M.C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R.M., Gucek, M., and van Balkom, B.W.M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles* *1*.
- Jung, K.-H., Chu, K., Lee, S.-T., Park, H.-K., Bahn, J.-J., Kim, D.-H., Kim, J.-H., Kim, M., Kun Lee, S., and Roh, J.-K. (2009). Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann. Neurol.* *66*, 191–199.
- Kalluri, R., and LeBleu, V.S. (2017). Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*
- Karantalis, V., and Hare, J.M. (2015). Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ. Res.* *116*, 1413–1430.
- Khan, M., Nickoloff, E., Abramova, T., Johnson, J., Verma, S.K., Krishnamurthy, P., Mackie, A.R., Vaughan, E., Garikipati, V.N.S., Benedict, C., et al. (2015). Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ. Res.* *117*, 52–64.
- Kim, C.W., Lee, H.M., Lee, T.H., Kang, C., Kleinman, H.K., and Gho, Y.S. (2002). Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* *62*, 6312–6317.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E968-977.

- van Laake, L.W., Passier, R., Monshouwer-Kloots, J., Verkleij, A.J., Lips, D.J., Freund, C., den Ouden, K., Ward-van Oostwaard, D., Korving, J., Tertoolen, L.G., et al. (2007). Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res.* *1*, 9–24.
- Laflamme, M.A., and Murry, C.E. (2005). Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* *23*, 845–856.
- Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* *4*, 214–222.
- Lakkaraju, A., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* *18*, 199–209.
- Lancaster, J.J., Repetti, G., Pandey, A., Weigand, K., Bahl, J.J., Juneman, E., and Goldman, S. (2016). Abstract 360: Implantation of an Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocyte Tissue Engineered Patch Improves Left Ventricular Function and Electro-mechanical Coupling in Rats With Heart Failure. *Circ. Res.* *119*, A360–A360.
- Leri, A., Kajstura, J., and Anversa, P. (2011). Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ. Res.* *109*, 941–961.
- Leroyer, A.S., Isobe, H., Lesèche, G., Castier, Y., Wassef, M., Mallat, Z., Binder, B.R., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2007). Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.* *49*, 772–777.
- Li, Q., Li, B., Wang, X., Leri, A., Jana, K.P., Liu, Y., Kajstura, J., Baserga, R., and Anversa, P. (1997). Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* *100*, 1991–1999.
- Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Azarin, S.M., Raval, K.K., Zhang, J., Kamp, T.J., and Palecek, S.P. (2012). Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E1848-1857.
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., and Palecek, S.P. (2013). Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* *8*, 162–175.
- Liu, J.-F., Wang, B.-W., Hung, H.-F., Chang, H., and Shyu, K.-G. (2008). Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* *107*, 165–174.
- Loyer, X., Vion, A.-C., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2014). Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ. Res.* *114*, 345–353.

- Ma, R., Liang, J., Huang, W., Guo, L., Cai, W., Wang, L., Paul, C., Yang, H.-T., Kim, H.W., and Wang, Y. (2017). Electrical Stimulation Enhances Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells for Myocardial Infarction Therapy. *Antioxid. Redox Signal.*
- Machida, T., Tomofuji, T., Maruyama, T., Yoneda, T., Ekuni, D., Azuma, T., Miyai, H., Mizuno, H., Kato, H., Tsutsumi, K., et al. (2016). miR-1246 and miR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol. Rep.* *36*, 2375–2381.
- Malliaras, K., Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Wu, E., Bonow, R.O., Marbán, L., Mendizabal, A., Cingolani, E., Johnston, P.V., et al. (2014). Intracoronary Cardiosphere-Derived Cells After Myocardial Infarction: Evidence of Therapeutic Regeneration in the Final 1-Year Results of the CADUCEUS Trial (Cardiosphere-Derived autologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction). *J. Am. Coll. Cardiol.* *63*, 110–122.
- Marleau, A.M., Chen, C.-S., Joyce, J.A., and Tullis, R.H. (2012). Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J. Transl. Med.* *10*, 134.
- Mazo, M., Gavira, J.J., Abizanda, G., Moreno, C., Eca, M., Soriano, M., Aranda, P., Collantes, M., Alegría, E., Merino, J., et al. (2010). Transplantation of mesenchymal stem cells exerts a greater long-term effect than bone marrow mononuclear cells in a chronic myocardial infarction model in rat. *Cell Transplant.* *19*, 313–328.
- McGough, I.J., and Vincent, J.-P. (2016). Exosomes in developmental signalling. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 2482–2493.
- Ménard, C., Hagege, A.A., Agbulut, O., Barro, M., Morichetti, M.C., Brasselet, C., Bel, A., Messas, E., Bissery, A., Bruneval, P., et al. (2005). Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet Lond. Engl.* *366*, 1005–1012.
- Menasché, P., and Vanneau, V. (2016). Stem cells for the treatment of heart failure. *Curr. Res. Transl. Med.* *64*, 97–106.
- Menasché, P., Hagege, A.A., Vilquin, J.-T., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., et al. (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *41*, 1078–1083.
- Menasché, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J.-T., Marolleau, J.-P., Seymour, B., Larghero, J., et al. (2008). The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* *117*, 1189–1200.
- Menasché, P., Vanneau, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* *36*, 2011–2017.

- Mirotsov, M., Jayawardena, T.M., Schmeckpeper, J., Gneccchi, M., and Dzau, V.J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *50*, 280–289.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., et al. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* *12*, 459–465.
- Moore, R.A., Lorts, A., Madueme, P.C., Taylor, M.D., and Morales, D.L.S. (2016). Virtual implantation of the 50cc SynCardia total artificial heart. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *35*, 824–827.
- Mozid, A., Yeo, C., Arnous, S., Ako, E., Saunders, N., Locca, D., Brookman, P., Archbold, R.A., Rothman, M., Mills, P., et al. (2014). Safety and feasibility of intramyocardial versus intracoronary delivery of autologous cell therapy in advanced heart failure: the REGENERATE-IHD pilot study. *Regen. Med.* *9*, 269–278.
- Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M.A., Virag, J.A.I., Ware, C.B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H., and Murry, C.E. (2007). Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 1345–1357.
- Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M., and Yanoshita, R. (2013). Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol. Pharm. Bull.* *36*, 66–75.
- Ohyashiki, J.H., Umezu, T., and Ohyashiki, K. (2016). Exosomes promote bone marrow angiogenesis in hematologic neoplasia: the role of hypoxia. *Curr. Opin. Hematol.* *23*, 268–273.
- Pacho, C., Domingo, M., Núñez, R., Lupón, J., Moliner, P., de Antonio, M., González, B., Santesmases, J., Vela, E., Tor, J., et al. Early Postdischarge STOP-HF-Clinic Reduces 30-day Readmissions in Old and Frail Patients With Heart Failure. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.*
- Palpant, N.J., Pabon, L., Friedman, C.E., Roberts, M., Hadland, B., Zaunbrecher, R.J., Bernstein, I., Zheng, Y., and Murry, C.E. (2017). Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* *12*, 15–31.
- Penny, W.F., and Hammond, H.K. (2017). Randomized Clinical Trials of Gene Transfer for Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Hum. Gene Ther.* *28*, 378–384.
- Perin, E.C., Dohmann, H.F.R., Borojevic, R., Silva, S.A., Sousa, A.L.S., Silva, G.V., Mesquita, C.T., Belém, L., Vaughn, W.K., Rangel, F.O.D., et al. (2004). Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* *110*, II213-218.
- Perin, E.C., Silva, G.V., Henry, T.D., Cabreira-Hansen, M.G., Moore, W.H., Coulter, S.A., Herlihy, J.P., Fernandes, M.R., Cheong, B.Y.C., Flamm, S.D., et al. (2011). A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am. Heart J.* *161*, 1078–1087.e3.

- Perin, E.C., Willerson, J.T., Pepine, C.J., Henry, T.D., Ellis, S.G., Zhao, D.X.M., Silva, G.V., Lai, D., Thomas, J.D., Kronenberg, M.W., et al. (2012). Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* *307*, 1717–1726.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J., and Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* *485*, 593–598.
- Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F., and Pitto, M. (2011). Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* *11*, 709–720.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* *20*, 1487–1495.
- Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* *481*, 295–305.
- Sahoo, S., and Losordo, D.W. (2014). Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ. Res.* *114*, 333–344.
- Sahoo, S., Klychko, E., Thorne, T., Misener, S., Schultz, K.M., Millay, M., Ito, A., Liu, T., Kamide, C., Agrawal, H., et al. (2011). Exosomes From Human CD34+ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity Novelty and Significance. *Circ. Res.* *109*, 724–728.
- Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., and Rice, G.E. (2013). Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PloS One* *8*, e68451.
- Sanganalmath, S.K., and Bolli, R. (2013). Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ. Res.* *113*, 810–834.
- Schuleri, K.H., Feigenbaum, G.S., Centola, M., Weiss, E.S., Zimmet, J.M., Turney, J., Kellner, J., Zviman, M.M., Hatzistergos, K.E., Detrick, B., et al. (2009). Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* *30*, 2722–2732.
- Seidman, J.G., and Seidman, C. (2001). The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* *104*, 557–567.
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., and Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 115–130.
- Silva, G.V., Litovsky, S., Assad, J.A.R., Sousa, A.L.S., Martin, B.J., Vela, D., Coulter, S.C., Lin, J., Ober, J., Vaughn, W.K., et al. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* *111*, 150–156.

- Silva, G.V., Fernandes, M.R., Cardoso, C.O., Sanz, R.R., Oliveira, E.M., Jimenez-Quevedo, P., Lopez, J., Angeli, F.S., Zheng, Y., Willerson, J.T., et al. (2011). A dosing study of bone marrow mononuclear cells for transendocardial injection in a pig model of chronic ischemic heart disease. *Tex. Heart Inst. J.* *38*, 219–224.
- Song, K., Nam, Y.-J., Luo, X., Qi, X., Tan, W., Huang, G.N., Acharya, A., Smith, C.L., Tallquist, M.D., Neilson, E.G., et al. (2012). Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* *485*, 599–604.
- Später, D., Hansson, E.M., Zangi, L., and Chien, K.R. (2014). How to make a cardiomyocyte. *Development* *141*, 4418–4431.
- Steppich, B., Mattisek, C., Sobczyk, D., Kastrati, A., Schömig, A., and Ott, I. (2005). Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* *93*, 35–39.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* *89*, 205–212.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., et al. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* *51*, 2105–2120.
- Sugiura, T., Hibino, N., Breuer, C.K., and Shinoka, T. (2016). Tissue-engineered cardiac patch seeded with human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes promoted the regeneration of host cardiomyocytes in a rat model. *J. Cardiothorac. Surg.* *11*, 163.
- Sun, Y., Zhang, J.Q., Zhang, J., and Lamparter, S. (2000). Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J. Lab. Clin. Med.* *135*, 316–323.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 183–193.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *110*, 13–21.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.

- Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction, Katus, H.A., Lindahl, B., Morrow, D.A., et al. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation* *126*, 2020–2035.
- Timmers, L., Lim, S.K., Arslan, F., Armstrong, J.S., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J., El Oakley, R.M., Choo, A., Lee, C.N., et al. (2007). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res.* *1*, 129–137.
- Timmers, L., Lim, S.K., Hofer, I.E., Arslan, F., Lai, R.C., van Oorschot, A.A.M., Goumans, M.J., Strijder, C., Sze, S.K., Choo, A., et al. (2011). Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* *6*, 206–214.
- Tokita, Y., Tang, X.-L., Li, Q., Wysoczynski, M., Hong, K.U., Nakamura, S., Wu, W.-J., Xie, W., Li, D., Hunt, G., et al. (2016). Repeated Administrations of Cardiac Progenitor Cells Are Markedly More Effective Than a Single Administration: A New Paradigm in Cell Therapy. *Circ. Res.* *119*, 635–651.
- Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., and Nichols, M. (2016). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur. Heart J.* *37*, 3232–3245.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* *319*, 1244–1247.
- Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B., and Emiliani, C. (2013). Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes* *4*, 152–170.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* *4*.
- Vrijssen, K.R., Sluijter, J.P.G., Schuchardt, M.W.L., van Balkom, B.W.M., Noort, W.A., Chamuleau, S. a. J., and Doevendans, P. a. F.M. (2010). Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1064–1070.
- Wahlgren, J., De L Karlson, T., Brisslert, M., Vaziri Sani, F., Telemo, E., Sunnerhagen, P., and Valadi, H. (2012). Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* *40*, e130.

- Wang, J.-G., Williams, J.C., Davis, B.K., Jacobson, K., Doerschuk, C.M., Ting, J.P.-Y., and Mackman, N. (2011). Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood* 118, 2366–2374.
- Wang, L., Liu, Z., Yin, C., Zhou, Y., Liu, J., and Qian, L. (2015). Improved Generation of Induced Cardiomyocytes Using a Polycistronic Construct Expressing Optimal Ratio of Gata4, Mef2c and Tbx5. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M.D., Tabi, Z., and Clayton, A. (2010). Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* 70, 9621–9630.
- Yamanaka, S. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* 10, 678–684.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4, 27066.
- Yin, M., Loyer, X., and Boulanger, C.M. (2015). Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* 763, 90–103.
- Yoon, Y.J., Kim, O.Y., and Gho, Y.S. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. *BMB Rep.* 47, 531.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yuan, A., Farber, E.L., Rapoport, A.L., Tejada, D., Deniskin, R., Akhmedov, N.B., and Farber, D.B. (2009). Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PloS One* 4, e4722.
- Zhang, S., Guo, J., Zhang, P., Liu, Y., Jia, Z., Ma, K., Li, W., Li, L., and Zhou, C. (2004). Long-term effects of bone marrow mononuclear cell transplantation on left ventricular function and remodeling in rats. *Life Sci.* 74, 2853–2864.
- Zheng, Y., Sampaio, L.C., Li, K., Silva, G.V., Cabreira-Hansen, M., Vela, D., Segura, A.M., Bovè, C., and Perin, E.C. (2013). Safety and Feasibility of Mapping and Stem Cell Delivery in the Presence of an Implanted Left Ventricular Assist Device. *Tex. Heart Inst. J.* 40, 229–234.

DEUXIÈME PARTIE : EVALUATION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES ISSUES DE PROGÉNITEURS CARDIOVASCULAIRES SSEA-1⁺ DÉRIVÉS DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Les études récentes du laboratoire et les travaux de recherche d'autres équipes supportent l'hypothèse que les cellules greffées libèrent des VE qui sont à l'origine des effets bénéfiques dans la réparation cardiaque. L'idée de cette première partie du projet de thèse est de comparer l'efficacité thérapeutique de VE avec celle de leurs cellules mères dans un modèle murin d'ICC. Dans la suite logique des travaux du laboratoire, les cellules thérapeutiques choisies sont les Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺ dérivés de CSEh (aussi appelés CD15⁺). L'obtention et la culture de ces cellules se fait dans l'unité de thérapie cellulaire dirigée par le Dr Jérôme Larghero à l'Hôpital Saint-Louis à Paris.

La première étape de ce projet a été la caractérisation des VE issues des Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺ *in vitro*. Une fois caractérisées, ces VE ont été testées dans un modèle murin d'ICC où l'évaluation de l'effet thérapeutique a été réalisée par échocardiographie, analyses histologiques et complétée par des analyses transcriptomiques des cœurs de souris. Une étude préliminaire des miARN présents dans ces VE a été initiée afin de déterminer les miARN qui pourraient être impliqués dans les effets thérapeutiques. Les VE investiguées représentent l'ensemble des VE sécrétées par les cellules (exosomes, MP, corps apoptotiques), étant donné qu'il est encore difficile de séparer correctement l'un des sous-types vésiculaires. De plus, l'étude des VE totales est plus significative puisque celles-ci se comparent au sécrétome des cellules greffées *in vivo*. Ce projet est, à notre connaissance, la première comparaison directe entre l'effet des cellules thérapeutiques et les VE qui en sont dérivées dans un modèle de pathologie cardio-vasculaire.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Culture et purification des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1⁺

Les Pg cardiovasculaires sont dérivés à partir de CSEh de la lignée I6, fournis généreusement par l'Institut Technion (Haïfa en Israël). Ces CSEh sont d'abord expansées sur fibroblastes nourriciers humains irradiés et cultivées en milieu Nutristem (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israël). Elles sont ensuite dirigées vers la voie cardiaque par traitement pendant 4 jours avec 10 ng/mL de BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein-2* ; Pfizer, New York, NY) en présence de 1 μ M de SU5402, un inhibiteur du récepteur du FGF, en milieu α MEM (*α -Minimum Essential Medium Eagle* ; Macopharma, Tourcoing, France) supplémenté avec 2% de sérum B27 sans insuline (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Les Pg cardiovasculaires dérivés de CSEh (Pg-CSEh) sont ensuite triés sur la présence du marqueur SSEA 1, l'un des marqueurs les plus précoces de différenciation des CSEh confirmant leur perte de pluripotence. Les Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺ sont ainsi capables de se différencier en CM mais aussi en cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. Le surnageant est aspiré, les cellules sont rincées au Phosphate Buffer Saline 1X (PBS) et trypsinées avec 4 mL de trypsine/EDTA par boîte de Pétri B15 pendant 4 minutes à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée en ajoutant 6 mL de tampon de tri avec de la DNase (pulmozyme®) par boîte de Pétri. Les cellules sont récupérées sur un tamis positionné sur un falcon 50 et plusieurs lavages au PBS sont effectués pour récupérer un maximum de cellules. Les cellules sont comptées sur cellule de Mallassez et 200 000 cellules sont prélevées pour les caractériser par cytométrie en flux (CMF). Les cellules sont centrifugées à 1100 rotations par minute (rpm) pendant 5 minutes et reprises dans du tampon de tri de manière à avoir 10 millions de cellules par 100 μ L. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C avec des billes Miltenyi couplées à un anticorps (Ac) anti-SSEA-1 (Miltenyi, Teterow, Germany), lavées avec 10 mL de PBS et centrifugées à 1100 rpm pendant 5 minutes puis sont reprises dans 1 mL de tampon de tri par colonne à raison de 5 millions de cellules par colonne. Les colonnes magnétiques Miltenyi L50 sont maintenues sur un aimant sur le support MACS separator, au-dessus d'un falcon 15 et sont imbibées avec 2 mL de tampon de tri. Les cellules sont transférées sur colonne, lavées trois fois avec le tampon de tri puis éluées par retrait de l'aimant avec 3 mL

de cette même solution. 200 000 cellules sont prélevées dans les fractions SSEA-1⁺ et SSEA-1⁻ pour caractérisation par CMF.

Les Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺ fraîchement générés sont alors, si validés par CMF, injectés directement chez la souris présentant une ICC à raison de 500 000 cellules par souris ou sont cultivés sur vitronectine (vitronectine recombinante humaine VTN-N, Life Technologies, Paisley, UK), une matrice acellulaire permettant la culture des Pg cardiovasculaires sans cellules nourricières, ce qui a l'avantage de ne pas contaminer le MC avec les VE sécrétées par les fibroblastes nourriciers. De plus, la vitronectine a été choisie du fait de sa compatibilité avec un usage clinique. Les Pg-CSEh sont cultivés pendant 48 heures dans du milieu de culture α MEM supplémenté de sérum B27 à 37°C et sous CO₂ à 5%. Au terme de ces 48 heures de culture, le MC contenant les VE est récupéré et les VE sont isolées par ultracentrifugation (voir 3.a ci-dessous). Les cellules sont quant à elles trypsinées et injectées chez la souris en ICC. Toute la culture cellulaire, de la cellule souche jusqu'à l'obtention des Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺, ainsi que la culture des cellules nourricières, se fait dans le laboratoire de thérapie cellulaire du Pr Jérôme Larghero à l'Hôpital Saint-Louis à Paris.

2. Caractérisation des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1⁺

a) *Caractérisation par CMF*

Les Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺ générés sont caractérisés par CMF afin de déterminer le pourcentage de différenciation des cellules grâce à un Ac anti-SSEA-1 couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Le niveau de mort cellulaire est aussi déterminé par CMF grâce à un Ac anti-Annexine-V (AnnV, Beckman Coulter, Villepinte, France) (début d'apoptose) ou 7-aminoactinomycine D (7AAD, Beckman Coulter) (apoptose très avancée). Les données sont acquises et analysées sur un cytomètre en flux (BD FACSCalibur, Becton Dickinson) avec le logiciel BD CellQuest Pro.

b) *Caractérisation par qPCR*

L'ARN total cellulaire des Pg cardiovasculaires SSEA-1⁺ est extrait avec le kit RNeasy (Qiagen S. A., Courtaboeuf, France) selon les recommandations du kit et quantifié par NanoDrop

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Une réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est réalisée pour les marqueurs *MEF2C*, *NANOG*, *SOX2*, *ISL1* normalisés sur le gène de ménage GAPDH (*Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase*) (Tableau 1). La caractérisation par CMF et qPCR se fait dans l'unité de thérapie cellulaire à l'Hôpital Saint-Louis.

huGAPDH-F	ATGGGCAAGGTGAAGGTCGGAG
huGAPDH-R	TCGCCCCGACTTGATTTTGCAGG
huMEF2C-F	AGATACCCACAACACACCACGCGCC
huMEF2C-R	ATCCTTCAGAGAGTCGCATGC
huNANOG-F	CAAAGGCAAACAACCCACTT
huNANOG-R	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
huSOX2-F	GACAGTTACGCGCACATGAA
huSOX2-R	AGCCGTTTCATGTAGGTCTCC
huISLET1-F	CGCGTGCGGACTGTGCTGAAC
huISLET1-R	TTGGGCTGCTGCTGCTGGAGT

Tableau 1 : séquence des primers utilisés en qPCR.

c) Caractérisation par marquages immuno-histochimiques

Les Pg cardiovasculaires fraîchement triés et après culture sur vitronectine sont cytopspinés à 300 g pendant 5 minutes à une concentration de 100 000 cellules par lame et fixés au paraformaldéhyde (PFA) à 4 %. Le stade de différenciation cellulaire est évalué par des Ac anti-ISL1 (dilution 1/500, ab20670, Abcam) et anti-MEF2C (dilution 1/50, ab79436, Abcam), deux marqueurs de mésoderme cardiaque précoce, et par un Ac neuronal anti-nestin (10C2, Abcam). L'apoptose est évaluée par un marquage fluorescent anti-caspase 3 activée (ab2302, dilution 1/20, Abcam).

3. Isolation et caractérisation des vésicules extracellulaires

a) Préparation par ultracentrifugation

Une culture de Pg-CSEh est spécifiquement dédiée à la caractérisation des VE (génération des Pg-CSEh, tri magnétique et culture sur vitronectine pendant 48 heures). Pour isoler les VE, le MC est récupéré après les 48 heures de culture des Pg-CSEh sur vitronectine et soumis à faible centrifugation à 1200 rpm pendant 6 minutes pour éliminer les cellules et débris cellulaires. Le MC est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation (355618, Beckman Coulter, Inc., Pasadena, CA, USA) et complété si nécessaire à environ 20 mL par tube avec du PBS filtré à 0,1 μm pour respecter la pression à l'intérieur du tube pendant l'ultracentrifugation. Après équilibrage des tubes deux à deux, ils sont ultracentrifugés à 99 855 g (37 500 rpm, rotor 60Ti, Beckman Coulter ; Beckman Optima Ultracentrifuge LE-80K, Beckman Coulter), pendant 16 heures à 4°C, avec accélération et décélération au maximum, ce qui permet de collecter toutes les différentes sous-populations de VE sécrétées (exosomes, MP, corps apoptotiques). Le surnageant est enlevé et le culot de VE est repris dans du milieu de culture αMEM filtré à 0,1 μm , dans le même volume que celui des cellules, pour injecter les VE libérées par 500 000 Pg-CSEh (Figure 12).

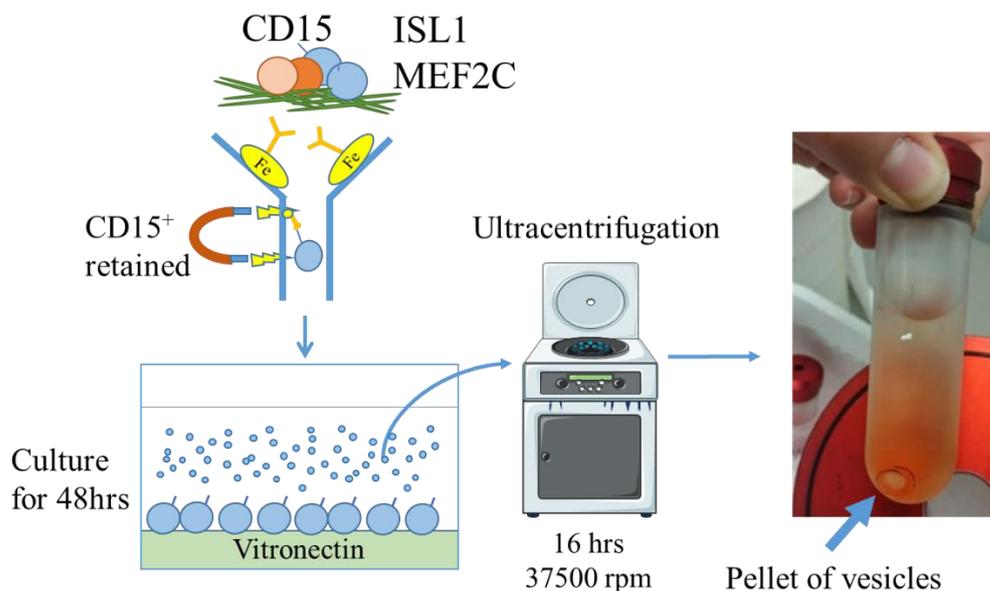


Figure 12 : Schéma regroupant les différentes étapes de la culture des Pg cardiovasculaires jusqu'à l'isolation des VE (culture des Pg, tri magnétique, culture sur vitronectine, ultracentrifugation, VE isolées).

b) *Caractérisation par NTA*

Les VE sont caractérisées en fonction de leur distribution de taille et de leur concentration par diffusion dynamique de la lumière grâce à un NanoSight (NanoSight LM14, Malvern, Malvern, UK). L'analyse du suivi individuel de particules (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), NTA 3.0, Malvern) exploite les propriétés de la lumière diffusée et du mouvement Brownien pour calculer la distribution de taille des particules en suspension dans un liquide (Figure 13). Une chambre d'échantillon est pourvue d'un faisceau laser qui la traverse. Lorsque le faisceau laser rencontre les particules en suspension dans cette chambre, celles-ci diffusent la lumière et peuvent être facilement visualisées par un microscope équipé d'un grossissement de 20x et d'une caméra. La caméra va enregistrer les mouvements Brownien de ces particules et le logiciel va pouvoir calculer le diamètre hydrodynamique à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein et déterminer la taille de ces particules. Pour une analyse fiable, on privilégie une dilution de l'échantillon, si nécessaire, au PBS filtré à 0,1 μm , de sorte à ce que les particules ne s'entrechoquent pas ce qui pourrait perturber leur mouvement et donc l'analyse (échantillon compris entre 20 et 100 particules à l'écran). On considère que les particules inférieures à 150 nm sont des exosomes et les particules comprises entre 150 et 1000 nm sont des MP ou des corps apoptotiques. Les particules ont été analysées à un niveau de caméra (*camera level*) à 8 et à un seuil de détection (*threshold*) à 5 à l'aide du NanoSight de l'équipe de Clotilde Théry à l'Institut Curie.

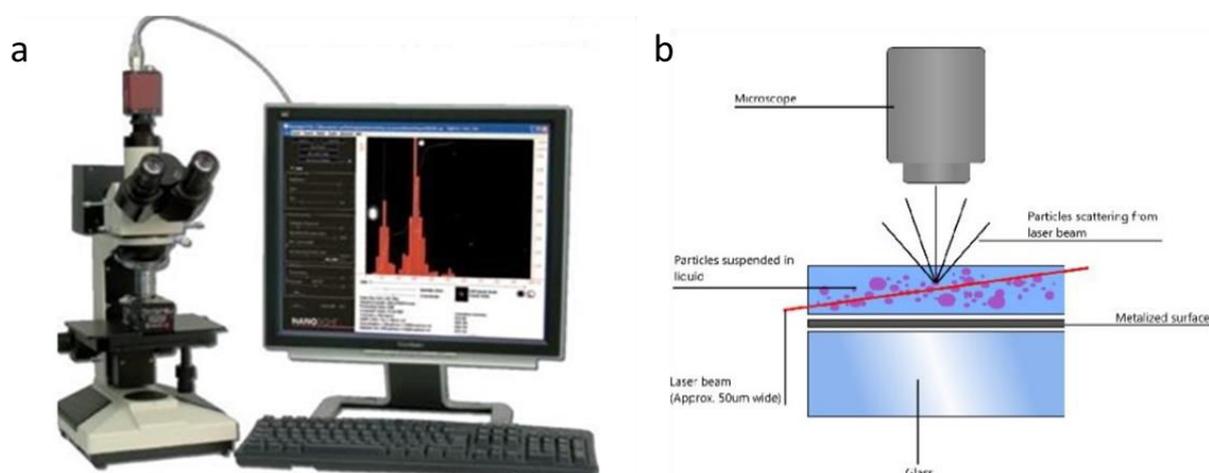


Figure 13 : a) Appareillage NanoSight LM10. b) Principe du NanoSight basé sur la diffusion dynamique de la lumière.

Le principe de l'analyse est simple. L'échantillon est chargé dans la chambre d'analyse grâce à une seringue d'1 mL. Cinq vidéos de 30 secondes sont enregistrées. Entre chaque vidéo,

l'échantillon est un peu plus chargé dans la chambre d'analyse en appuyant sur le bouton poussoir de la seringue afin de changer de champs d'analyse de façon à analyser de manière homogène l'échantillon. A la fin de l'acquisition, le logiciel détecte les particules, évalue leur mouvement Brownien, peut ainsi calculer leur taille sur chaque vidéo et présente les résultats sous forme de moyenne de ces 5 vidéos (Figure 14). Un échantillon est analysé deux fois et une moyenne est réalisée entre les deux résultats.

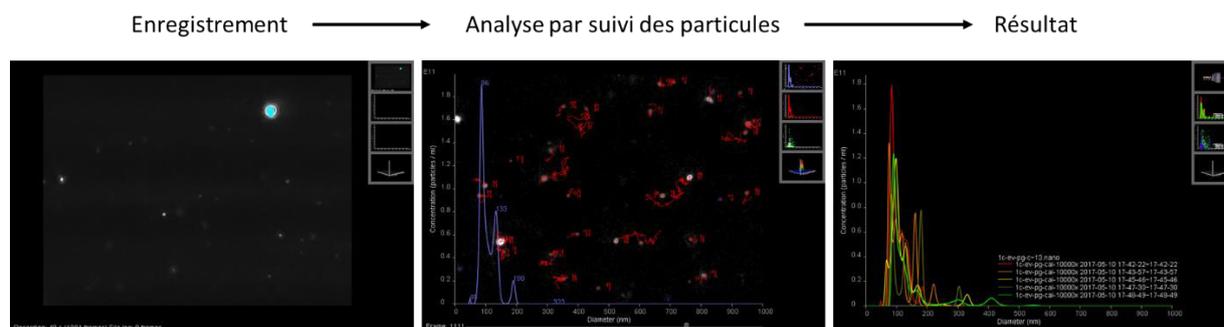


Figure 14 : Principe du NanoSight pour la caractérisation des VE.

c) Caractérisation par qNano

Afin de confirmer les résultats obtenus par l'analyse NTA, les VE ont été caractérisées par une autre technologie permettant de déterminer à nouveau leur concentration et leur distribution de taille, le qNano (Izon Science, Oxford, UK). Cette technique utilise un autre procédé d'analyse qui est basé sur le TRPS (*Tunable Resistive Pulse Sensing*) (Figure 15). Les VE sont entraînées à travers un nano-pore par pression et chaque particule va provoquer une impulsion résistive, ou signal de blocage, qui est détectée et mesurée par le logiciel d'application :

- l'amplitude de blocage est directement proportionnelle au volume de chaque particule
- la durée du blocage varie avec la vitesse de la particule et est utilisée pour calculer la charge de surface de chaque particule
- la fréquence de blocage est utilisée pour déterminer la concentration des particules.

Les valeurs d'amplitude, de durée et de fréquence sont converties en mesures de particules par calibration avec des particules de taille, de concentration et de charge de surface connues. La taille du nano-pore est choisie par rapport à la taille des VE de notre échantillon et le nano-pore Np100 a été retenu dans notre cas puisqu'il permet d'analyser les VE dont la taille est comprise entre 50 et 330 nm (taille estimée grâce à l'analyse NTA).

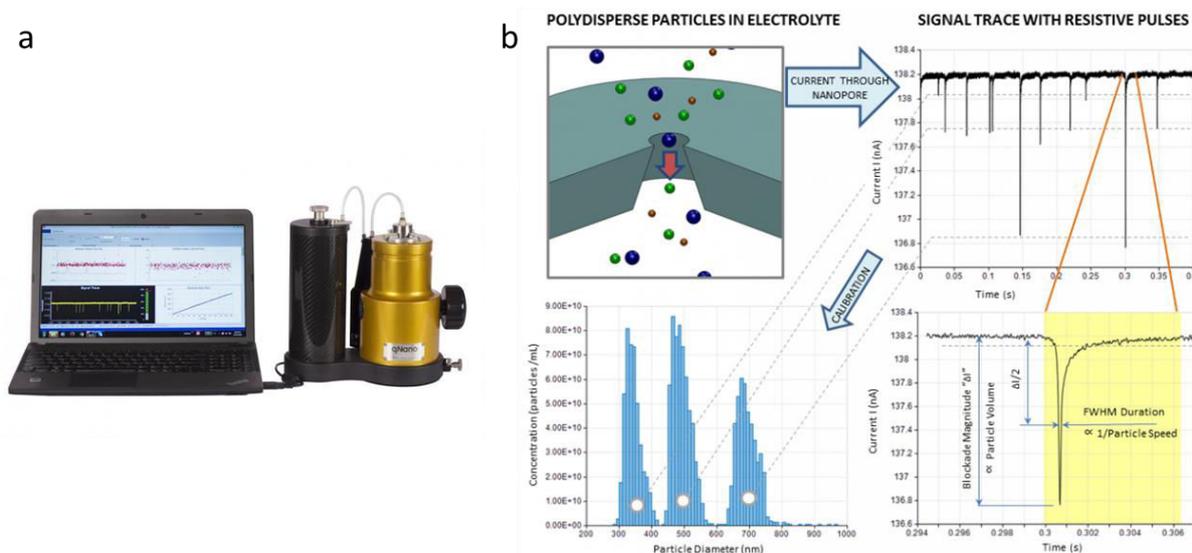


Figure 15 : a) Appareillage qNano. b) Schéma explicatif de l'analyse qNano.

d) Caractérisation par ELISA

Afin de caractériser ces particules, la méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est utilisée. Le marqueur CD9 a été choisi puisqu'il est un marqueur spécifique commun à tous les exosomes provenant de n'importe quel type cellulaire (ExoELISA™, EXOEL-CD9A-1, SBI System Biosciences, Mountain View, CA, USA). Il permet de confirmer la présence d'exosomes contenus dans nos préparations de VE mais aussi de quantifier le nombre d'exosomes isolés par ultracentrifugation. Le principe repose sur la lyse des particules et de leurs protéines qui vont directement être immobilisées sur la plaque. Un Ac anti-CD9 est ajouté qui va reconnaître les exosomes et sera révélé par un second Ac couplé à l'enzyme peroxydase pour amplifier le signal fluorescent et augmenter la sensibilité du test. Un substrat colorimétrique est utilisé pour révéler la coloration qui sera proportionnelle à la quantité d'antigènes CD9 présents (quantification semi-quantitative).

Une gamme étalon d'une protéine standard est d'abord réalisée afin de comparer la concentration de notre échantillon à une gamme de concentration connue. Des dilutions en séries sont réalisées afin d'obtenir une gamme allant de 0 à 1.35×10^{10} exosomes. 50 μL de protéines standard et de préparations de VE sont transvasées dans une plaque 96 puits, en duplicata. La plaque est recouverte d'un film plastique et incubée à 37°C pendant 2 heures. Après incubation, les puits sont vidés et lavés trois fois 5 minutes avec 100 μL de solution 1X

Wash Buffer. 50 µL d'Ac primaire CD9 dilué au 1:100 dans la solution 1X blocking buffer sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée à température ambiante pendant 1 heure sous agitation. Après trois lavages de 5 minutes comme précédemment, 50 µL d'Ac secondaire dilué au 1:5000 dans la solution 1X blocking buffer sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée à température ambiante pendant 1 heure sous agitation. Après trois lavages, la réaction de colorimétrie est déclenchée par l'ajout de 50 µL par puits de substrat Super-sensitive TMB ELISA et la plaque est incubée à température ambiante pendant 15 à 45 minutes sous agitation. La réaction est stoppée par l'ajout de 50 µL par puits de Stop buffer et l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

e) *Caractérisation par cryo-microscopie électronique à transmission*

Afin d'observer la forme et l'aspect des VE, la technique de la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET) a été choisie. La préparation des VE pour visualisation au cryo-MET commence par le dépôt de 2 µL d'échantillon sur une grille de carbone qui est rapidement plongée dans un bain d'éthane liquide refroidi à l'azote liquide, ce qui congèle l'échantillon instantanément (LEICA EM CPC, Wien, Austria). La grille congelée est alors montée sur un porte-objet (Gatan inc., Warrendale, PA, USA) et observée directement à -180°C grâce à un microscope électronique à transmission JEOL 2100HC à 200 kV avec filament LaB6. L'acquisition des images est réalisée avec le logiciel Digital Micrograph (version 1.83.842, Gatan inc.). Cette technique a été réalisée sur la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris-Seine à Paris.

4. Mise en place du modèle animal d'insuffisance cardiaque chronique

a) *Comité d'éthique et règle des 3R*

La rédaction du formulaire pour le comité d'éthique a été la première étape avant d'entamer les expérimentations sur l'animal. La procédure a été approuvée par le comité d'éthique et par le Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche (projet 04073.01) et respecte la législation Européenne (Directive du Conseil 86/609/CEE) qui vise la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales. Cette directive Européenne permet d'assurer une harmonisation des dispositions législatives, réglementaires et administratives

relatives à la protection des animaux. "Cette harmonisation devrait réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, assurer à ces animaux des soins adéquats, empêcher qu'aucune douleur, souffrance, angoisse ou dommage durable inutile ne leur soient infligés et veiller à ce que ces atteintes, lorsqu'elles sont inévitables, soient réduites au minimum ; considérant qu'il convient notamment d'éviter tout double emploi inutile des expériences," , texte constituant la loi des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Toute expérimentation est classée en fonction du type de sévérité (légère, modérée, sévère, sans réveil) et la médication et les moyens utilisés pour réduire ou supprimer la douleur doivent tenir compte de cette classification.

Réduire :

La première composante de la règle des 3R est donc de réduire le nombre d'animaux utilisé en expérimentation animale. Différentes voies permettent de satisfaire cet aspect : limiter l'utilisation des animaux aux seules expériences considérées comme indispensables, éviter les répétitions inutiles, comme par exemple, ne pas reproduire des études qui ont déjà été réalisées antérieurement par une autre équipe de recherche ou encore écrire un protocole détaillé, pertinent, au but clair qui n'aura pas besoin d'être répété pour confirmer les résultats.

La prise en compte de la règle des 3R dans ce projet a été très importante puisque l'induction d'un IDM est une procédure de type sévère. Afin de répondre à cette règle, la réduction au maximum du nombre d'animaux a été faite grâce à une statisticienne interne au laboratoire. Afin de comparer les évolutions moyennes du volume télésystolique (VTS), paramètre cardiaque le plus pertinent pour évaluer la fonction cardiaque (Alonso-Betanzos et al., 2015), entre l'inclusion et la fin de l'étude, un test de Student est utilisé. Sur la base d'une hypothèse d'une différence de 4 mm^3 soit $4 \mu\text{L}$ entre les groupes traités et contrôles observée dans des études pilotes, pour un écart-type égal à 4, un risque $\alpha=5\%$ et une puissance de 80%, il nous faut au minimum 17 animaux par groupe, selon la formule de O'Brien et Muller (1993) afin d'avoir des résultats exploitables. En considérant une mortalité et une exclusion de 50% des animaux, 34 animaux par groupe au début de chaque expérimentation sont donc nécessaires.

Raffiner :

Le raffinement représente les méthodes et les moyens mis en place afin de prévenir, réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse. Elle passe par la médication en administrant les anesthésiques, les analgésiques et les anti-inflammatoires adéquats (dose, voie, durée et fréquence d'administration) en fonction de la procédure et de sa classification, mais aussi par les conditions d'hébergement, d'élevage et de soins (cage adéquate à l'espèce, enrichissement des cages, surveillance des animaux). Le raffinement se fait tout au long de la vie des animaux, c'est-à-dire avant, pendant et après l'expérimentation. Raffiner avant l'expérimentation consiste à choisir le modèle animal adéquat, augmenter le bien-être des animaux en améliorant leur condition de transport, d'élevage et d'hébergement, ainsi qu'à planifier un protocole correctement détaillé en déterminant des points limites (moment où la souffrance et/ou la détresse d'un animal d'expérimentation doit être diminuée, minimisée ou arrêtée). Ces points doivent être établis le plus précocement possible en fonction de l'objectif du projet et selon la balance « risque/bénéfice » du projet de recherche. Le raffinement pendant l'expérimentation correspond aux méthodes choisies et aux procédures expérimentales utilisées : les techniques dites non invasives sont privilégiées, des soins pré-, per- et post-opératoires adéquats sont administrés, les méthodes appropriées d'anesthésie, d'analgésie et/ou d'euthanasie sont utilisées, les points limites établis préalablement sont appliqués et les tests douloureux sont évités. Raffiner après l'expérimentation correspond à la bonne analyse et exploitation des résultats obtenus lors de l'expérimentation animale. Les méthodes de raffinement utilisées dans notre projet sont précisées dans les protocoles décrits ci-dessous.

Remplacer :

Il s'agit ici de remplacer les modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* ou *in silico* (modèles bio-informatiques) par exemple dès que cela est possible. Ces méthodes alternatives sont la plupart du temps des méthodes complémentaires d'un projet de recherche mais sont de plus en plus sollicitées, notamment dans les domaines de la recherche fondamentale et appliquée.

b) *Choix du modèle*

Au vu de la règle des 3R, le modèle choisi a été la souris pour sa facilité d'expérimentation et de manipulation, son faible coût, sa disponibilité, sa large base de données comparatives ainsi

que l'expérience ancienne de ce modèle par notre équipe. La souris nude, c'est-à-dire immunodéficiente qui ne possède pas de lymphocytes B, a été sélectionnée pour sa capacité à ne pas rejeter les cellules humaines qui seront injectées et les VE qui sont en dérivées et donc dans un souci de facilité (pas d'injection d'immunosuppresseurs comme la ciclosporine par exemple, tous les jours du traitement jusqu'au sacrifice).

c) *Induction de l'insuffisance cardiaque chronique chez la souris*

L'induction de l'ICC chez la souris par ligature permanente de l'artère coronaire descendante antérieure gauche est un protocole qui a été mis en place par notre laboratoire depuis plusieurs années. Un entraînement long et rigoureux ainsi qu'une optimisation de la technique ont été nécessaires afin d'obtenir un modèle reproductible tout au long des expérimentations.

Des souris mâles immunodéficientes (nude) (type Rj/NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), âgées de 7 à 9 semaines sont hébergées dans l'animalerie pendant une semaine après leur arrivée pour leur acclimatation. Dans une pièce de microchirurgie stérile, les souris âgées de 8 à 10 semaines sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (IP) d'une solution mixte de kétamine/xylazine diluée dans du sérum physiologique (kétamine 1000, Virbac, Wissous, France, posologie : 110 mg/kg ; xylazine à 2%, Bayer, La Garenne-Colombes, France, posologie : 11mg/kg.). Approximativement 15 minutes après l'anesthésie, les souris sont intubées avec un cathéter souple et placées sous respiration artificielle à l'air ambiant (Minivent type 845, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) durant toute la durée de la procédure chirurgicale (150 mouvements/minutes et 300 µL/mouvements). La procédure est complétée par l'application du gel lubrithal (Centravet, Maisons-Alfort, France) sur les yeux de la souris pour éviter le dessèchement durant la procédure. Les souris sont positionnées en position décubitus dorsal sur une plaque chauffante à 37°C afin d'éviter l'hypothermie et sous une source de lumière froide pour éviter le dessèchement des tissus. Le thorax est stérilisé à l'aide de bétadine dermique 10%. Une incision cutanée horizontale est réalisée pour exposer le muscle pectoral, qui est rétracté. Une thoracotomie gauche est réalisée dans le troisième espace intercostal pour exposer le VG. En utilisant une loupe binoculaire pour visualiser le cœur, le péricarde est ouvert. L'artère coronaire gauche descendante est ligaturée avec un fil de suture non résorbable 7/0 (26S05F, Péters Surgical, Bobigny, France) en regard

de son tiers proximal (Figure 16a). La ligature de l'artère coronaire est confirmée par un blanchiment instantané du myocarde (Figure 16b). Un cathéter est placé dans l'espace intercostal sous-jacent pour l'exsufflation du pneumothorax. La cage thoracique est fermée hermétiquement par quatre points séparés au fil de suture non résorbable 6/0 (26S07A, Péters Surgical). Une seringue est utilisée pour aspirer l'air de la cage thoracique via le cathéter et permettre à la souris de reprendre une respiration adéquate (aspiration d'environ 0,4 mL d'air). La peau est fermée par un surjet en utilisant du fil 6/0. La zone fermée hermétiquement est badigeonnée à la bétadine dermique 10%. Deux pulvérisations de spray de xylocaine à 10% (10 mg de lidocaïne/pulvérisation, AstraZeneca, Courbevoie, France) sont appliquées sur le site de l'incision. Une injection d'environ 200 μ L de sérum physiologique est réalisée en intrapéritonéale pour réhydrater la souris. Lorsqu'elle est suffisamment réveillée (réflexe des pattes arrière et des vibrisses), elle est désintubée et baguée pour son identification. L'animal est alors repositionné dans une cage d'hébergement propre jusqu'à son réveil complet et maintenu dans un environnement chauffé. Les animaux sont ensuite surveillés pendant les 3 jours suivant leur opération. En cas de souffrance excessive, une injection de buprénorphine à 0,1 mg/kg, un morphinique, est administrée afin de le soulager. Si des signes de souffrance persistent (isolement de l'animal, dos courbé, apathie, perte de la relation avec les autres animaux de la cage, maigreur, tremblements), l'animal est mis à mort par dislocation cervicale.

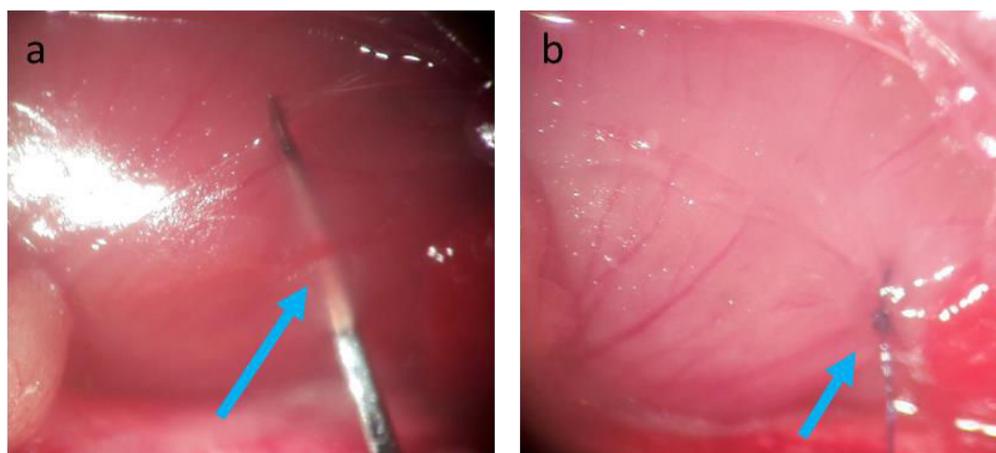


Figure 16 : Photos de l'artère coronaire descendante antérieure gauche. a) passage de l'aiguille pour sa ligature. b) ligature de l'artère coronaire.

d) *Confirmation du modèle*

Trois semaines après l'induction de l'IDM, la fibrose cicatricielle est installée et stable, les souris sont en ICC. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (1,5%, 2 L/mn), installées sur la plateforme d'échographie VisualSonics et maintenues sous isoflurane sur plaque chauffante. Du gel écho-conducteur est appliqué sur le thorax de la souris et les paramètres cardiaques sont évalués par échographie à l'aide d'un échographe VisualSonics 2100 équipé d'une sonde de 40 MHz. Les paramètres cardiaques d'évaluation du modèle et de la maladie retenus sont le VTS, le VTD et la FE en mode bidimensionnel sur une coupe parasternale grand axe. Seuls les animaux ayant une FE inférieure à 50% sont inclus dans l'étude, les autres souris servant de compagnons pour diminuer le stress des souris malades. Les examens échographiques sont pratiqués par le Dr Hany Nemetalla, un cardiologue formé à ce type d'expérimentations. Les animaux sont répartis dans les différents groupes de traitement de manière aléatoire.

5. Injections transcutanées guidées par échographie

a) *Justification du choix de la technique*

La plupart des traitements intra-myocardiques testés chez la souris le sont généralement dans la foulée quasi-immédiate de l'occlusion coronaire en raison de la mortalité très élevée d'une ré-intervention chirurgicale. Pour concilier la possibilité d'une injection à distance, au stade de l'IC installée et un taux de survie acceptable, nous nous sommes tournés vers une autre technique développée par le Pr Marc Ruel de l'Université de l'Ottawa Heart Institute au Canada, l'injection transcutanée guidée par échographie à thorax fermé. Cette technique, considérée comme minimalement invasive, est une très bonne alternative qui permet l'administration d'un traitement plusieurs semaines après la création de l'infarctus au prix d'une très faible mortalité. L'acquisition de cette technique a été faite grâce à la venue du Dr Hadi Toeg de l'équipe du Pr Marc Ruel qui nous a formées pendant 2 semaines.

b) *Principe de la technique*

La souris est endormie par anesthésie gazeuse à l'isoflurane dans une cage à anesthésie (2%, 2 L/mn) et immobilisée en position de décubitus dorsal sur une plaque chauffante avec maintien de l'anesthésie gazeuse (1,5%, 2 L/mn) sur la station d'imagerie VisualSonics Vevo 770 (Figure

17a). Toute la procédure se fait sous contrôle électrocardiographique. Du gel écho-conducteur est appliqué sur le thorax de la souris avant le placement de la sonde de 40Hz et la région infarctée est localisée en coupe parasternale grand axe en vue bidimensionnelle. Une seringue de 1 mL équipée d'une aiguille de 27 gauge (27G), contenant la solution à injecter, est placée sur le micromanipulateur, biseau vers le haut. Il est ainsi possible de guider l'aiguille, sous contrôle échographique, jusqu'à l'endroit de l'injection désiré qui, dans notre cas, se situe dans la zone péri-infarctée du myocarde, dans la paroi antérieure du VG. Plusieurs étapes sont nécessaires avant l'injection myocardique : passage de l'aiguille à travers la peau, passage de l'aiguille à travers les côtes puis entrée de l'aiguille dans le myocarde péri-infarcté sans percer l'endocarde. Une bonne injection se traduit par un myocarde plus échogène après l'injection et parfois épaissi (Figure 17b). Une mauvaise injection se traduit par une augmentation du volume de l'espace intercostal (aiguille pas assez pénétrante dans le myocarde) ou par la visualisation du liquide injecté à l'intérieur du VG sous forme de bulles (aiguille ayant perforé l'endocarde). Il est possible de faire plusieurs injections dans le cœur, à différents endroits, avec un maximum de 15 μ L par injection et de 60 μ L maximum par cœur. Une fois les injections terminées, l'aiguille est délicatement retirée et la souris est remise dans sa cage chauffée pour son réveil à côté de ses congénères pour éviter l'angoisse.

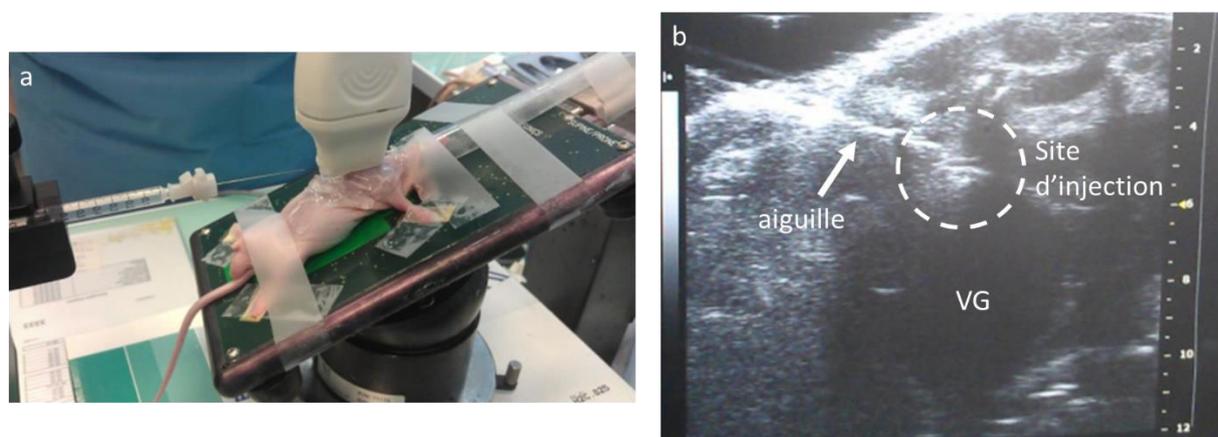


Figure 17 : a) Mise en place de la souris sur la station d'imagerie VisualSonics Vevo 770. b) Visualisation par échocardiographie d'une injection intra-myocardique dans un cœur de souris en ICC.

c) Les différents traitements

Les Pg-CSEh fraîchement générés ou récupérés après culture sur vitronectine sont injectés chez la souris présentant une ICC à raison de 500 000 Pg par souris, répartis en trois injections de 10

μL en trois zones distinctes dans le myocarde péri-infarci. Les VE provenant des Pg-CSEh cultivés sur vitronectine sont reprises dans le même volume de resuspension des cellules pour injecter chez la souris l'équivalent des VE dérivées de 500 000 cellules. Le même volume, soit 30 μL de milieu αMEM filtré à 0,1 μm, est injecté aux souris en tant que contrôle négatif.

6. Le modèle expérimental *in vivo*

a) *Schéma expérimental*

Dans cette première étude, 308 souris mâles immunodéficientes (nude), âgées de 7 à 9 semaines, ont été infarcies. Ces souris ont été réparties en 3 grandes séries d'expériences. Pour chaque série, le schéma expérimental reste le même (Figure 18). Environ trois semaines après l'IDM, la fibrose cicatricielle est achevée et les souris présentent une ICC. Les paramètres cardiaques, incluant le VTS, le VTD et la FE, sont alors mesurés pour servir de valeurs de base avant l'administration du traitement. Seules les souris présentant une ICC suffisamment importante (FE inférieure à 50%) sont incluses dans l'étude. Les souris incluses sont réparties aléatoirement en plusieurs groupes de traitement (Pg-CSEh fraîchement triés, Pg-CSEh après culture sur vitronectine, VE dérivées des Pg-CSEh cultivés sur vitronectine, milieu αMEM contrôle) (voir ci-dessous). Ces souris reçoivent le traitement qui leur a été attribué par des injections transcutanées guidées par échographie dans le myocarde péri-infarci. Environ six semaines plus tard, la fonction cardiaque est de nouveau évaluée par échocardiographie bidimensionnelle par le même opérateur en aveugle des groupes de traitement, afin de comparer l'évolution de la fonction cardiaque intra- et inter-groupe. Les souris sont ensuite sacrifiées et le cœur est congelé et conservé à -80°C. Deux types d'analyse sont réalisés : des analyses histologiques et immuno-histochimiques afin d'évaluer l'efficacité du traitement macroscopiquement et des analyses transcriptomiques.

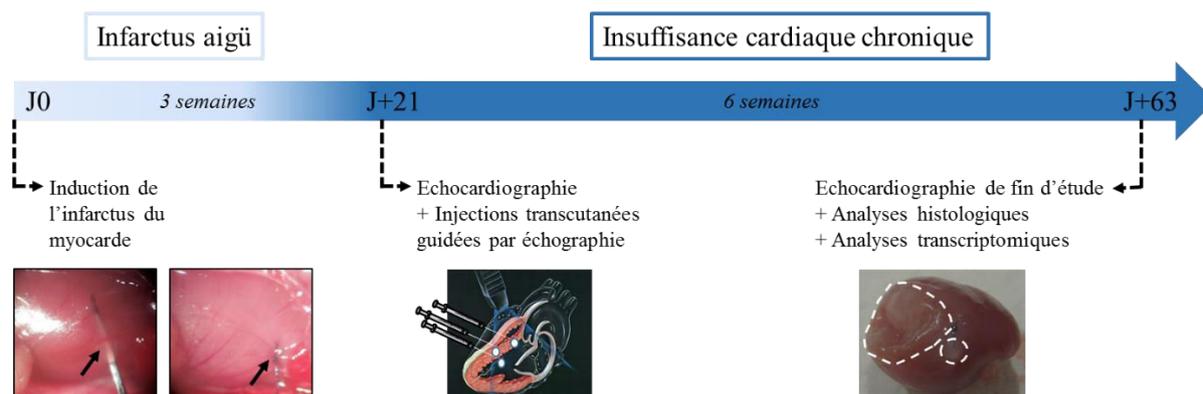


Figure 18 : Schéma global expérimental *in vivo*.

b) Les différentes séries d'expérimentations

Dans cette première partie du projet de thèse, trois grandes séries d'expérimentations *in vivo* et une série *in vitro* sont réalisées (Figure 19).

La série 1 a pour objectif de valider le potentiel thérapeutique des Pg-CSEh après différenciation et tri magnétique. Les souris incluses dans l'étude sont séparées en deux groupes de traitement : le premier reçoit l'équivalent de 500 000 Pg-CSEh fraîchement générés par souris, le deuxième reçoit du milieu α MEM.

Afin de tester les VE sécrétées par ces mêmes Pg-CSEh, les Pg-CSEh triés sont cultivés sur vitronectine, une matrice acellulaire évitant la culture sur cellules nourricières afin de ne pas avoir de VE contaminantes dérivant de ces cellules, pendant 48 heures. Cette deuxième série a pour objectif de comparer le potentiel thérapeutique des Pg-CSEh avec les VE libérées par les Pg-CSEh issus de cette même culture. Les souris incluses dans l'étude sont donc séparées en trois groupes de traitement : le premier reçoit 500 000 Pg-CSEh par souris, le deuxième reçoit les VE dérivées de 500 000 Pg-CSEh par souris et le troisième groupe reçoit de l' α MEM. Six semaines après l'administration du traitement, et après l'échographie d'évaluation, le cœur est prélevé et l'efficacité du traitement est évaluée par : analyses histologiques, immunohistochimiques et transcriptomiques.

Les Pg-CSEh étant cultivés sur vitronectine pendant 48 heures pour en récupérer les VE, leur phénotype pourrait différer de celui des Pg-CSEh fraîchement injectés. L'objectif de cette

troisième série est donc de comparer le potentiel thérapeutique de Pg-CSEh fraîchement triés avec celui des Pg-CSEh cultivés après 48 heures sur vitronectine. Dans cette série, les Pg-CSEh ont été séparés en deux fractions après le tri magnétique : une fraction a été directement injectée aux souris présentant une ICC et l'autre fraction a été ensemencée sur vitronectine pendant 48 heures pour la production et l'injection des VE dérivées des Pg-CSEh chez les souris en ICC. Cette comparaison est exclusivement étudiée par analyses transcriptomiques sur les cœurs explantés.

La série 4 consiste exclusivement en la caractérisation *in vitro* des VE sécrétées par les Pg-CSEh cultivés pendant 48 heures sur vitronectine. Le nombre de VE et leur distribution de taille sont quantifiés par NanoSight et qNano, leur identité est caractérisée grâce à un test ELISA anti-CD9 et leur morphologie est visualisée par cryo-MET, comme décrit précédemment.

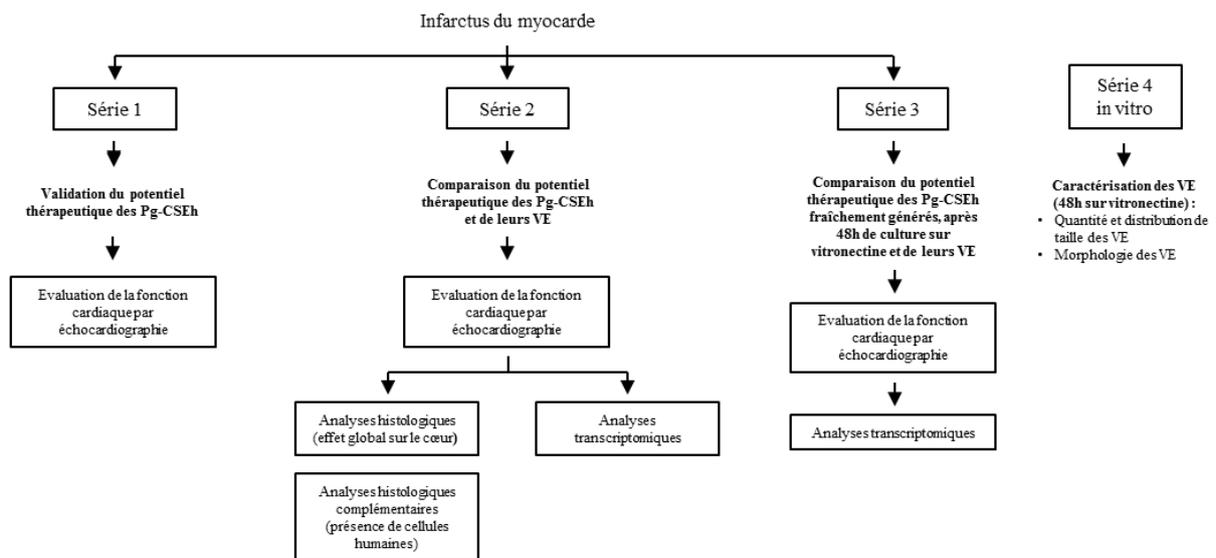


Figure 19 : Les différentes séries d'expérimentations chez la souris insuffisante cardiaque et analyses *in vitro*.

c) Evaluation de l'effet thérapeutique

Comme énoncé ci-dessus, l'évaluation du traitement se fait par échocardiographie bidimensionnelle par mesure des paramètres cardiaques (VTS, VTD et FE) par un cardiologue en aveugle des groupes de traitement.

L'efficacité du traitement est aussi évaluée par des analyses histologiques et immuno-histochimiques et analyses transcriptomiques. Après les échocardiographies, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et le cœur est prélevé et mis à nu délicatement en enlevant les adhérences. Les cœurs sont répartis en deux groupes d'analyse :

- Analyses histologiques : les cœurs sont coupés en deux parties égales transversalement et les deux parties sont immergées dans le milieu d'enrobage O.C.T. (Optimal Cutting Temperature, CellPath, Newtown, UK) dans une cupule, congelées en azote liquide et conservées à -80°C
- Analyses transcriptomiques : les cœurs sont congelés en cryotube dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les analyses sont faites sur la plateforme de bio-informatique GENOMIC à l'Institut Cochin.

Analyses histologiques et immuno-histochimiques :

Des coupes d'une épaisseur de 7 µm sont réalisées au cryostat (CM 1850, Leica, Wetzlar, Allemagne) : 30 lames sur 8 niveaux sont effectuées (4 niveaux de l'apex et 4 niveaux de la base du cœur). Les lames sont analysées par coloration à l'hématoxyline-éosine (Mayer, Fluka) et rouge Sirius (0.1 %, 30 min, BDH Chemicals, Poole, Angleterre) afin de déterminer respectivement la taille de l'infarctus et le degré de fibrose. Par ailleurs, des immunomarquages à la lectine (Isolectine B4-FITC, Griffonia Simplicifolia, 50 µg/mL, CliniScience) et à l'actine α du muscle lisse (anti-SMA, A5228, dilution au 1/400^e, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) permettent de quantifier la densité des capillaires et des artérioles. Un marquage de l'isolectine combinée à l'agglutinine de germe de blé marqué au Texas Red (WGA – *Wheat Germ Agglutinin*, FL-1020, Burlingame, CA, USA) est utilisé pour déterminer la taille des CM. De plus, un marquage anti-lamine A/C (Novocastra, A.Menarini, 35954, dilution 1/300, Rungis, France) est réalisé pour identifier les Pg-CSEh greffés par un marquage de la membrane nucléaire des cellules humaines (détails des colorations et marquages en Annexe 1). Les colorations sont analysées à l'aide d'un scanner de lames (service Immunologie Biologique, plateforme immunomonitoring de l'Hôpital Européen Georges Pompidou dirigée par Florence Marliot) puis quantifiées manuellement grâce au logiciel Metamorph®. Les immunomarquages sont analysés à l'aide du microscope à fluorescence Leica DM 2000 (Leica, Wetzlar, Allemagne) couplé à une caméra Quicam CDD (Qimaging Corp., Surrey, BC, Canada) puis

quantifiés manuellement grâce au logiciel Metamorph® Version 6.3r.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Pour chaque souris et pour chaque coloration, 3 lames sont analysées selon cet exemple : les lames n°2, 12 et 22 sont sélectionnées pour la coloration au rouge Sirius. Chacune correspond à 8 niveaux de cœur différents. Les lames sont colorées et 6 coupes de la base et 6 coupes de l'apex sont analysées sur les 3 lames sélectionnées de façon à analyser la fibrose de manière globale sur tout l'ensemble du cœur. Concernant les marquages immuno-histochimiques, les champs sont sélectionnés de manière à analyser le marquage dans la zone péri-infarctée et 6 à 10 champs sont analysés sur les lames n, n+10, n+20.

Analyses transcriptomiques :

L'ARN total des cœurs congelés en cryotube est extrait par phénol/chloroforme. Les cœurs sont broyés dans 1 mL de TRI REAGENT (T9424, Sigma Aldrich) et incubés 5 minutes à température ambiante. 200 µL de chloroforme sont ajoutés, la solution de broyage est vortexée pendant 20 secondes, puis incubée 2 à 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont soumis à une centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 minutes qui les sépare en trois phases distinctes : la phase supérieure contenant l'ARN, la phase intermédiaire contenant l'ADN et la phase inférieure contenant les protéines. La phase supérieure est méticuleusement récupérée, en faisant attention de ne pas la contaminer avec les autres phases, et transférée dans un tube Eppendorf propre. 500 µL d'isopropanol sont ajoutés, la solution est incubée pendant 10 minutes à température ambiante et centrifugée à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour faire précipiter l'ARN. Le culot est lavé deux fois avec 75% d'éthanol, séché pendant 15-30 minutes à température ambiante et dissous dans 500 µL d'eau pure (sans nucléases) pendant 10 minutes à 55°C. L'ARN est stocké à -20°C.

Les animaux avec des valeurs pré-greffes similaires pour chaque traitement sont sélectionnés pour les analyses transcriptomiques. Les échantillons sont analysés sur puce Affymetrix (Affymetrix GeneChip® Mouse Transcriptome Array 1.0, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) afin d'analyser l'expression de 25336 gènes murins présents sur la puce. Les données brutes sont importées dans le logiciel R/Bioconductor qui permet de traiter et d'analyser les données. Les niveaux d'expression de gènes sont normalisés, et le bruit de fond est déterminé selon des

algorithmes personnalisés. En supposant qu'un maximum de 80% des gènes soient exprimés sur une puce donnée, les 20% des sondes restantes avec l'intensité la plus faible sont considérées comme du bruit de fond. Un seuil est fixé à deux écart-types par rapport à la moyenne du bruit de fond. Toutes les sondes pour lesquelles les intensités normalisées sont inférieures au seuil calculé sont désignées comme du bruit de fond. Deux types d'analyse sont alors réalisés. D'abord, une analyse dite non supervisée permet de détecter les biais expérimentaux et les valeurs aberrantes par une analyse en composantes principales (ACP, *Principal Component Analysis (PCA)*) et regroupement hiérarchique. Dans un second temps, une analyse dite supervisée est réalisée par application du modèle statistique ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) à chaque gène afin d'obtenir une p-value et un fold-change par gène et par comparaison entre deux groupes en utilisant le logiciel Partek Genomics Suite (Partek, Inc., Saint-Louis, MO, USA). Ces statistiques permettent ensuite de filtrer la liste complète de gènes sur la p-value et le fold-change pour obtenir la liste de gènes différentiellement exprimés pour chaque comparaison. L'interprétation des résultats par analyse fonctionnelle des listes de gènes est réalisée grâce à des outils bioinformatiques et des bases de données comme le logiciel Ingenuity Pathway (Ingenuity Pathway Analysis, IPA, Qiagen). Les listes de gènes sont intégrées à la bibliographie par recherche de fonctions, de voies de signalisation ou encore de régulateurs, ce qui nous donne une prédiction des acteurs moléculaires impliqués dans les différents effets des traitements. Toutes les données obtenues ont été soumises et validées par le site Gene Expression Omnibus (numéro d'accès GSE69401). Les analyses transcriptomiques ont été réalisées sur la plateforme de bio-informatique GENOMIC à l'Institut Cochin. Les analyses des données générées par la puce ont été faites en étroite collaboration avec un bio-informaticien rattaché à la plateforme.

7. Suivi des vésicules extracellulaires après injections intra-myocardiques

a) *Les marqueurs testés*

Les solutions de marquage DiD, DiO, DiI et DiR (aussi appelé DiOC₁₈(7)) sont des colorants fluorescents lipophiles de la famille des (carbo)cyanines utilisés pour le marquage des membranes et autres structure hydrophobes (Figure 20a). Une fois rajoutés dans le milieu de culture à dose adéquate, sur cellules adhérentes ou en suspension, les marqueurs vont diffuser latéralement à l'intérieur des membranes plasmiques des cellules et les marquer

uniformément. Pour ce type d'application, un marqueur diffusant dans le rouge est préféré aux autres pour diminuer les problèmes d'auto-fluorescence liés aux tissus. Le DiD, qui a un spectre d'émission et d'excitation respectivement de 644 nm et 665 nm, ainsi que le DiR (750 et 780 nm) ont été choisis car ils émettent tous deux dans le rouge, voire dans l'infrarouge pour le DiR (Figure 20b et c). Ces deux marqueurs ont déjà été validés comme étant stables lorsqu'ils sont incorporés dans les membranes et sans danger pour l'animal (Grange et al., 2014; Mohtasebi et al., 2014; Texier et al., 2009).

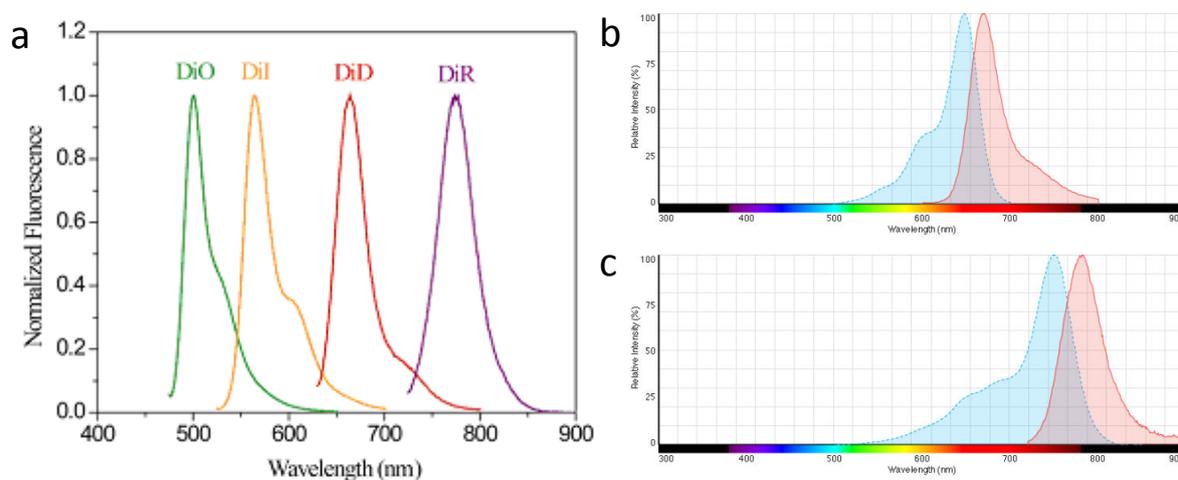


Figure 20: (a) Spectre d'émission de la fluorescence normalisé du DiO, DiI, DiD et DiR lorsqu'ils sont liés à une membrane bicouche lipidique. (b) Spectre d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) du DiD. (c) Spectre d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) du DiR.

b) Méthode de marquage

Avant injection chez la souris, un test de marquage a été réalisé afin de comparer le DiD et le DiR. Après récupération du MC, les solutions de marquage DiD (V22887, Life Technologies, Eugene, OR) et DiR (D12731, Life Technologies) sont ajoutées respectivement à deux tubes de 17 mL de MC à une concentration finale de 1 $\mu\text{mol/L}$ chacun. Les MC sont ultracentrifugés à 99 855 g pendant 90 minutes à 4°C (37 500 rpm, rotor 60Ti, Beckman Coulter). Les surnageants sont enlevés délicatement pour ne pas décoller le culot de VE et 17 mL de PBS filtré à 0,1 μm sont ajoutés afin de laver les culots de VE pour éliminer l'excès de marqueur (non internalisé dans les vésicules) qui pourrait contaminer les cellules cardiaques lors des injections. Une seconde ultracentrifugation à 99 855 g pendant 65 minutes à 4°C est réalisée ainsi qu'un second lavage dans les mêmes conditions. Le culot de VE est resuspendu dans 300

μL de PBS supplémenté de 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) filtré à 0,1 μm et congelé à -80°C. L'intensité des VE marquées avec les deux marqueurs est analysée au Photon Imager RT (Biospace Lab, Nesles la Vallée, France).

c) *Injection des VE chez la souris*

Afin de valider la méthode d'injection des VE, les VE préalablement marquées avec une solution de marquage cellulaire Vybrant DiD sont injectées dans le myocarde péri-infarci d'une souris en ICC par injections transcutanées guidées par échographie. Comme précédemment, trois injections de 10 μL sont réalisées. Des croquettes sans luzerne sont administrées à l'animal une semaine avant les injections pour ne pas avoir de fluorescence contaminante (Inoue et al., 2008). Vingt-six heures après les injections intra-myocardiques, la souris est sacrifiée par dislocation et le cœur est prélevé. Les VE fluorescentes dans le cœur sont visualisées grâce au Photon Imager RT et la quantité de VE injectées est analysée par dosage BCA selon les recommandations du kit.

8. Analyse des miARNs des vésicules extracellulaires

a) *Culture des Pg-CSEh et isolation des VE*

Après différenciation des CSEh, tri magnétique et caractérisation par CMF comme expliqué précédemment, les Pg-CSEh ont été incorporés dans des patchs de fibrine afin d'augmenter leur viabilité puisque la vitronectine ne le permet pas. Cette technique a été choisie car les travaux précédents du laboratoire ont montré que l'incorporation des Pg-CSEh dans un patch de fibrine permet de conserver leur viabilité sans en affecter leur phénotype (Bellamy et al., 2015). Après tri magnétique, la pureté et la viabilité (7AAD-) des Pg-CSEh sont analysées par CMF. Le patch est formé en mixant 5 (1 patch) ou 10 millions (1 patch) de Pg-CSEh fraîchement triés à 1,1 mL de solution de fibrinogène (20 mg/mL) et de milieu α-MEM dans une boîte de pétri coatée préalablement à l'agarose de 20 cm² (conditions utilisées dans l'essai clinique en cours : Menasché et al., 2015). Quatre unités de thrombine sont ajoutées et la boîte de pétri est incubée à 37°C pendant environ 5-10 minutes pour permettre la polymérisation du patch ayant incorporé les Pg-CSEh. Après 24 heures de culture des patchs dans l'αMEM à 37°C et 5% CO₂, les MC sont collectés, soumis à basse centrifugation à 600 g pendant 15 minutes pour enlever les débris

cellulaires et des patchs puis ultracentrifugés pour collecter les VE à 99 855 g pendant 16 heures à 4°C. Les VE sont reprises dans 300 µL de PBS 1X filtré à 0,1 µm et stockées à -80°C. Au total, deux préparations différentes de Pg-CSEh ont été incluses dans des patchs de fibrine.

b) *Extraction des ARN totaux*

Une extraction des ARN totaux a été effectuée directement sur les VE grâce au kit mirVana (AM1560, ThermoFisher Scientific) qui a la propriété de conserver aussi les petits ARN dans les préparations tels que les miARN et les siARN. En effet, les extractions d'ARN traditionnelles basées sur une précipitation des ARN à l'alcool ne récupèrent pas quantitativement les ARN de très petites tailles. L'extraction avec le kit mirVana est basée sur une extraction organique suivie par une immobilisation des ARN sur un filtre en fibre de verre afin de purifier les préparations d'ARN et se révèle être une méthode efficace, simple et rapide.

Les VE sont tout d'abord lysées en ajoutant 600 µL de solution de lyse qui stabilise l'ARN et inactive les RNases et les échantillons sont vortexés vigoureusement pour lyser correctement les VE et obtenir un lysat homogène. Les lysats sont transférés dans un tube Eppendorf de 2 mL, auxquels 1/10 de miR Homogenate Additive est rajouté, puis ils sont vortexés et incubés sur glace pendant 10 minutes. Sous une hotte chimique, un volume d'acide-phénol:chloroforme est ajouté aux échantillons afin de procéder à l'extraction organique qui permet une grande purification de l'ARN. Les échantillons sont vortexés pendant 30 à 60 secondes et centrifugés à 10 000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les échantillons sont séparés en trois phases distinctes : la phase supérieure contenant les ARN totaux, la phase intermédiaire contenant l'ADN et la phase inférieure contenant les protéines. La phase supérieure est récupérée méticuleusement et transférée dans un tube Eppendorf de 2 mL. Le protocole est ensuite adapté afin de récupérer les ARN totaux (autre protocole possible pour récupérer uniquement les petits ARN). Pour cela, 1,25 volume d'éthanol 100% est ajouté aux échantillons qui sont ensuite vortexés vigoureusement. Un filtre est placé dans un tube de collection propre et 700 µL maximum sont chargés sur le filtre. Une centrifugation rapide à 10 000 g pendant 15 secondes permet d'éluer l'échantillon sur la colonne. Le liquide est jeté, les ARN étant immobilisés sur la colonne, et cette dernière étape est répétée jusqu'à ce que toute la solution de lysat/éthanol soit éluee au travers de la colonne. Des lavages respectifs avec la solution de lavage 1 (1 lavage) et la solution de lavage 2/3 (2 lavages) sont réalisés en ajoutant

respectivement 700 μ L et 500 μ L de solution de lavage sur la colonne, centrifugés à 10 000 g pendant 5 à 10 secondes pour éluer les solutions et les solutions de lavages sont jetées. La colonne est transférée dans un nouveau tube de collection et le tube est centrifugé à 10 000 g pendant 1 minute pour enlever les fluides résiduels sur la colonne. La colonne est de nouveau transférée dans un nouveau tube de collection propre et les ARN totaux sont élués avec 100 μ L de solution d'élution pré-chauffée à 95°C grâce à une centrifugation à 10 000 g pendant 30 secondes. Les solutions d'ARN sont conservées sur glace, dosées par Nanodrop et congelées à -20°C.

c) *Analyse des miARN*

Les échantillons d'ARN totaux sont d'abord concentrés, leur qualité est analysée par bioanalyseur, puis ils sont analysés par NanoString. Cette technique, simple et sensible, permet ici d'identifier les miARN présents dans les VE. Deux sondes sont présentes et conçues pour chaque cible d'intérêt. La première est une sonde de capture, couplée à une biotine, qui permet d'immobiliser les miARN d'intérêt sur le support. La deuxième sonde, appelée « rapporteur », est spécifique à la molécule d'intérêt. Elle est composée de 6 fluorochromes de 4 couleurs différentes dont l'arrangement définit un code-barre qui est spécifique à un miARN. Sur une puce, 800 miARN différents peuvent être analysés simultanément. La première étape est donc l'hybridation du miARN sur la première sonde. Puis, les complexes sonde-cible sont ensuite alignés et un système optique va identifier les code-couleurs. L'intérêt de cette technique est que la détection est directe, c'est-à-dire qu'elle ne demande pas d'amplification linéaire (puce) ou exponentielle (PCR). Les quantifications sont précises et reflètent la réalité biologique. Cette expérience a été réalisée sur la plateforme de bioinformatique du Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute à La Jolla, Californie, USA.

9. Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée en aveugle du groupe de traitement par Marie-Cécile Perier, membre indépendant du Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC) de l'Inserm U970. Des tests paramétriques de Student appariés sont utilisés pour comparer l'évolution de la fonction et des volumes cardiaques avant et après traitement. Des tests d'analyse de variance (ANOVA), avec ajustement de Tukey pour les comparaisons multiples 2 à 2, sont effectués

pour les données obtenues par échocardiographie et les données histologiques. Pour toutes les analyses, le seuil de significativité des tests bilatéraux est fixé à 5%. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne +/- erreur type (SEM). Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1. Caractérisation des progéniteurs cardiovasculaires SSEA-1⁺

Sur les quatre grandes séries d'expérimentations (trois séries dédiées à l'étude chez la souris en ICC et une série dédiée à la caractérisation des VE *in vitro*), 8 spécifications des CSEh suivies d'un tri magnétique pour en isoler les Pg-CSEh ont été réalisées. La fraction SSEA-1⁺ immédiatement récupérée après tri magnétique a été caractérisée par CMF et qPCR après 48 heures de culture sur vitronectine (Tableau 2). Le profil d'expression de ces cellules a été comparé à celui des CSEh I6. Les cellules caractérisées directement après le tri magnétique montrent une pureté (moyenne de 88,8% ± 3%) et une viabilité (moyenne de 96,0% ± 1%) très reproductibles entre les différentes cultures et tris. La caractérisation par qPCR révèle que les marqueurs de pluripotence NANOG et SOX2 sont sous-exprimés et que les marqueurs cardiovasculaires précoces tels que ISL1 et MEF2C sont surexprimés, à des degrés différents, ce qui montre que les cellules ont perdu leur pluripotence et sont engagées dans la voie cardiovasculaire. Pour seulement une préparation (tri 2b), le niveau d'expression de SOX2 est plus élevé que les autres, possiblement dû à une contamination de cellules engagées vers la voie neuronale, puisqu'en effet, une augmentation du marqueur neuronal NES a été constatée (valeur de 2,159). Toutefois, ces données suggèrent que la technique de spécification des CSEh vers la voie cardiaque selon le protocole de Blin et al, suivie d'un tri magnétique anti-SSEA-1⁺ pour en isoler les Pg-CSEh, se révèle efficace pour obtenir une préparation de Pg-CSEh pure et viable de manière reproductible. De plus, les cellules ont bien un phénotype engagé vers la voie cardiovasculaire avec perte des marqueurs de pluripotence.

Pour les séries d'expérimentations 2, 3 et 4, les Pg-CSEh obtenus ont été cultivés sur vitronectine pendant 48 heures pour en récupérer les VE sécrétées. La caractérisation par CMF permet de constater que cette procédure diminue considérablement la viabilité des Pg-CSEh, ce qui est corrélé à une augmentation de l'apoptose. C'est pourquoi, pour certains tris, la caractérisation par CMF n'a pas été possible par manque de matériel.

Séries d'expérimentations	Tri	Immédiatement après tri magnétique						Après 48h de culture sur vitronectine	
		Caractérisation par FACS		Caractérisation par qPCR				Caractérisation par FACS	
		Pureté	Viabilité (7AAD -)	<i>NANOG</i>	<i>SOX2</i>	<i>ISL-1</i>	<i>MEF2C</i>	Apoptose (Annexine V+)	Viabilité (Bleu Trypan -)
1	1a	93.0%	99.0%	0.019	0.354	3.148	0.360	N/A	N/A
	1b	93.4%	90.0%	0.412	0.810	23.264	1.518	N/A	N/A
2	2a	73.6%	99.4%	0.090	1.660	7.850	3.160	N/A	N/A
	2b	89.7%	97.2%	0.536	7.624	285.166	18.175	N/A	N/A
	2c	82.3%	97.5%	0.033	0.266	52.960	21.908	88.9%	21,7%
	2d	86.9%	93.0%	0.014	0.008	440.149	9.171	89.8%	36,5%
3	3	92.4%	95.3%	0.898	1.14	75.845	N/A	N/A	N/A
4	4	99.0%	96.6%	0.202	0.046	198.422	15.05	61.2%	81,3%

Tableau 2 : Caractérisation des Pg-CSEh par CMF et qPCR, directement après tri magnétique et après 48 heures de culture sur vitronectine pour chaque tri réalisé pour les différentes séries d'expérimentations. Les valeurs sont exprimées en prenant comme référence les valeurs des CSEh I6.

Les Pg-CSEh de la série d'expérimentations 4 (*in vitro*) ont été caractérisés par immunohistochimie immédiatement après le tri magnétique et après 48 heures de culture sur vitronectine (Figure 21). Après tri magnétique, les cellules ont un faible taux d'apoptose (environ 5% des cellules sont positives à la caspase-3 activée) et expriment les marqueurs cardiovasculaires précoces tels que ISL1 et MEF2C (plus de 90% de cellules positives). Après 48 heures de culture sur vitronectine, l'apoptose est un peu plus élevée (environ 15% des cellules) mais les cellules expriment les marqueurs cardiovasculaires ISL1 et MEF2C avec la même intensité qu'en sortie de tri magnétique (plus de 90% des cellules positives). Ces résultats suggèrent que la culture sur vitronectine maintient le phénotype des Pg-CSEh mais augmente leur apoptose. Cependant, les données d'apoptose obtenues par CMF (moyenne de 80% ± 13%) sont différentes de celles obtenues par marquage immuno-histochimique (environ 15%). Cela pourrait s'expliquer par la perte ou l'explosion des cellules déjà fragilisées lors du cytopspin, alors que la CMF peut comptabiliser les cellules mortes ou en apoptose. La culture sur vitronectine ne permettrait donc pas de conserver une bonne viabilité de ces cellules après tri magnétique malgré une bonne préservation de leur phénotype.

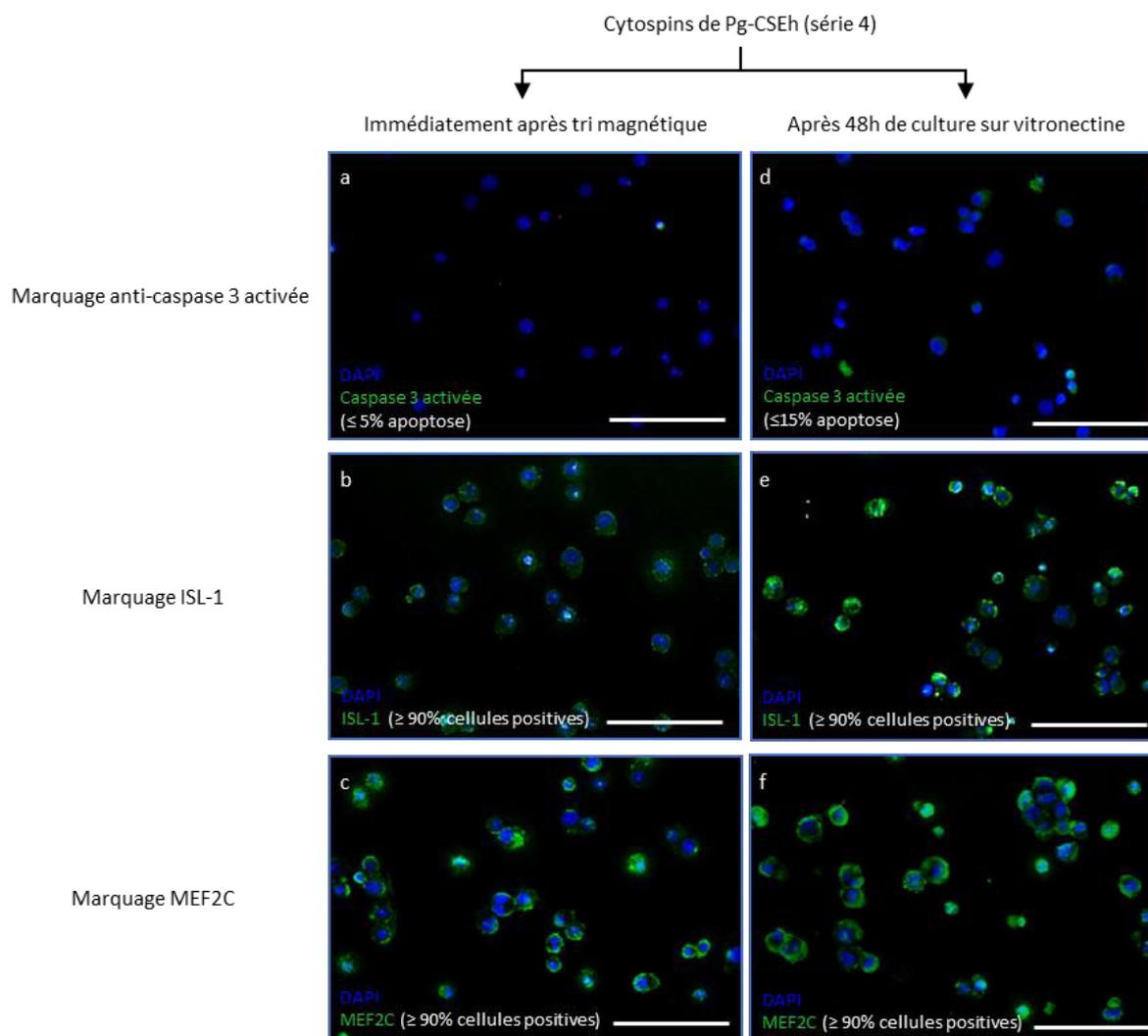


Figure 21 : Analyses immuno-histochimiques des Pg-CSEh immédiatement après tri magnétique (a-c) et après 48 heures de culture sur vitronectine (d-f). Echelle : 100 μ m.

2. Caractérisation des vésicules extracellulaires

Après 48 heures de culture des Pg-CSEh sur vitronectine, le MC est collecté et soumis à ultracentrifugation pour en récupérer les VE totales. Les VE ont d'abord été caractérisées par NanoSight afin de déterminer leur concentration et leur distribution de taille. Pour chaque série d'expérimentations (à l'exception de la série 1), les VE ont été analysées par NanoSight à un niveau de caméra 8 et à un seuil de détection de 5. Les spectres (Figure 22), les valeurs et les pourcentages de particules ayant la taille d'exosomes, MP et corps apoptotiques (Tableau 3) entre les deux différentes dilutions d'un échantillon sont très similaires, ce qui montre la reproductibilité de la technique. Il semblerait que les Pg-CSEh sécrètent principalement des

particules de la taille des exosomes et des MP plutôt que de grandes particules de la taille des corps apoptotiques.

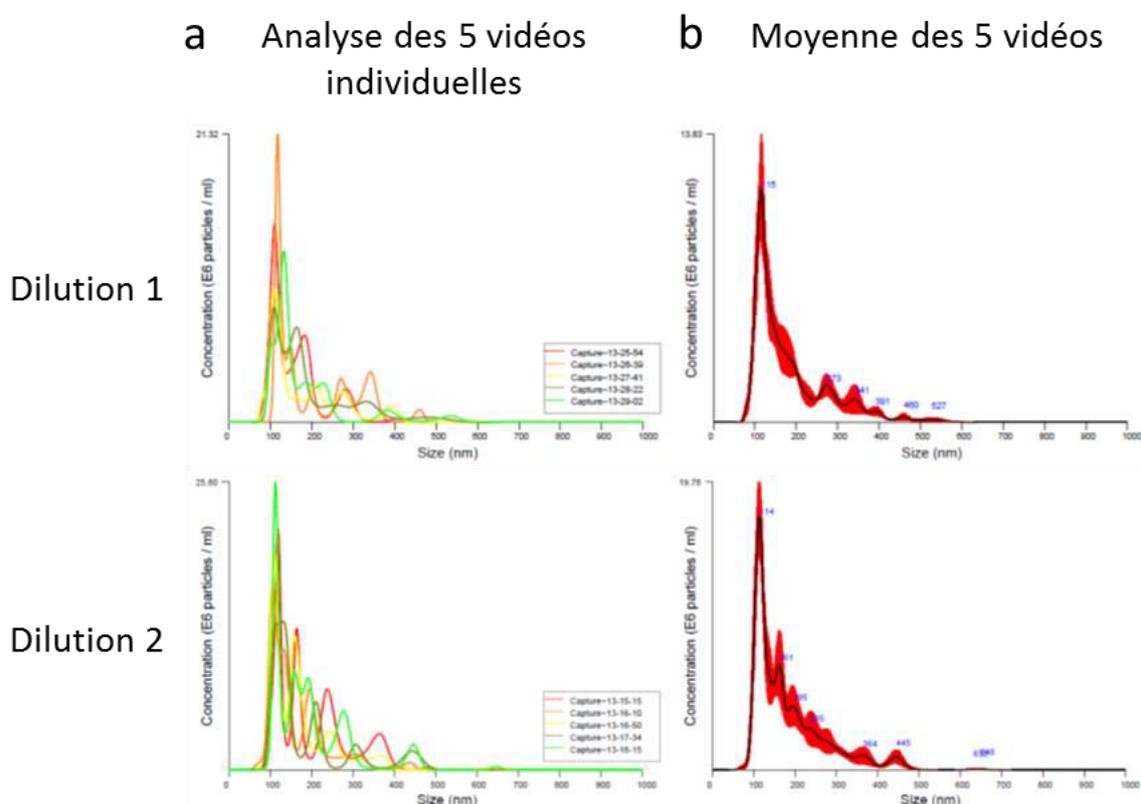


Figure 22 : Spectres de la distribution de taille des VE de la série d'expérimentations 4 par analyse au NTA. a) Spectres des 5 vidéos individuelles pour chaque dilution. b) Spectres des VE moyennés à partir des 5 spectres pour chaque dilution.

	Concentration (particules/Pg-CSEh)	Particules/Pg-CSEh	Taille moyenne (nm)	Taille médiane (nm)	% particules (<150 nm)	Particules (<150 nm)/Pg-CSEh	% particules (151-500 nm)	Particules (151-500 nm)/Pg-CSEh	% particules (501-1000)	Particules (501-1000)/Pg-CSEh
Dilution 1	3,91E+07	1374	183	113	48%	655	52%	715	0%	4
Dilution 2	5,19E+07	1823	182	115	51%	930	48%	876	1%	17
Moyenne	4,55E+07	1598	183	114	50%	793	50%	796	1%	11

Tableau 3 : Caractéristiques des VE de la série d'expérimentations 4 évaluées par NanoSight pour chaque dilution.

Dans un deuxième temps, la comparaison des données du NanoSight entre les différentes préparations de VE montre que les concentrations de VE et leur distribution de taille sont là encore reproductibles d'une préparation à une autre avec un rendement moyen de 1 338 particules par Pg-CSEh (Tableau 4). La quantité des particules considérées comme exosomes (<150 nm) est aussi reproductible avec une moyenne de 43%, ce qui correspond à la sécrétion de 579 exosomes en moyenne par Pg-CSEh en 48 heures de culture. Les Pg-CSEh libéreraient

donc principalement des MP (151-500 nm) qui représentent environ 56% des particules totales libérées par ces cellules avec une moyenne de 746 MP libérées par Pg-CSEh en 48 heures.

Séries d'expérimentations	NanoSight										qNano				ELISA CD9
	Concentration (particules/μL)	Particules /Pg-CSEh	Taille moyenne (nm)	Taille médiane (nm)	% particules (<150 nm)	Particules (<150 nm)/Pg-CSEh	% particules (151-500 nm)	Particules (151-500 nm)/Pg-CSEh	% particules (501-1000)	Particules (501-1000)/Pg-CSEh	Concentration (particules/μL)	Particules/Pg-CSEh	Taille moyenne (nm)	Taille médiane (nm)	Exosomes/Pg-CSEh
1	N/A										N/A				N/A
2	2,29E+07	884	183	127	43%	383	56%	499	1%	4	N/A				2435
3	2,60E+07	1530	194	135	38%	569	61%	942	1%	19	N/A				N/A
4	4,55E+07	1598	182	114	49%	784	50%	796	1%	11	1,20E+07	422	117	87	1060
Moyenne	3,15E+07	1338	186	125	43%	579	56%	746	1%	11	N/A				1748

Tableau 4 : Caractéristiques des VE de chaque série d'expérimentations analysées au NTA, au qNano et par test ELISA sur le marqueur de surface CD9.

Dans la série d'expérimentations 4, les VE ont aussi été caractérisées par qNano afin de confirmer les résultats obtenus par NTA. Les deux spectres de la distribution de taille des VE obtenus par ces deux méthodes sont très similaires (Figure 23), à l'exception d'un léger décalage de la distribution de taille vers la gauche avec l'analyse au qNano suggérant des VE globalement plus petites, probablement dû à une différence entre les deux technologies utilisées. Effectivement, la taille moyenne de VE est décalée de 182 nm avec l'analyse par NanoSight à 117 nm avec le qNano (-65 nm) ; de même la taille des VE au pic de concentration passe de 114 nm pour le NanoSight à 87 nm pour le qNano (-27 nm). Le second graphique de l'analyse au qNano représente la durée du blocage en fonction du diamètre de la particule et indique que les particules détectées ont globalement la même forme avec seulement un faible pourcentage de VE fusionnées entre elles (flèche sur le graphique, environ 3% des VE détectées). Ceci indique que la technique de l'ultracentrifugation induit une très légère fusion des VE ou que les VE ont formé de petits agrégats lors de la resuspension du culot de VE.

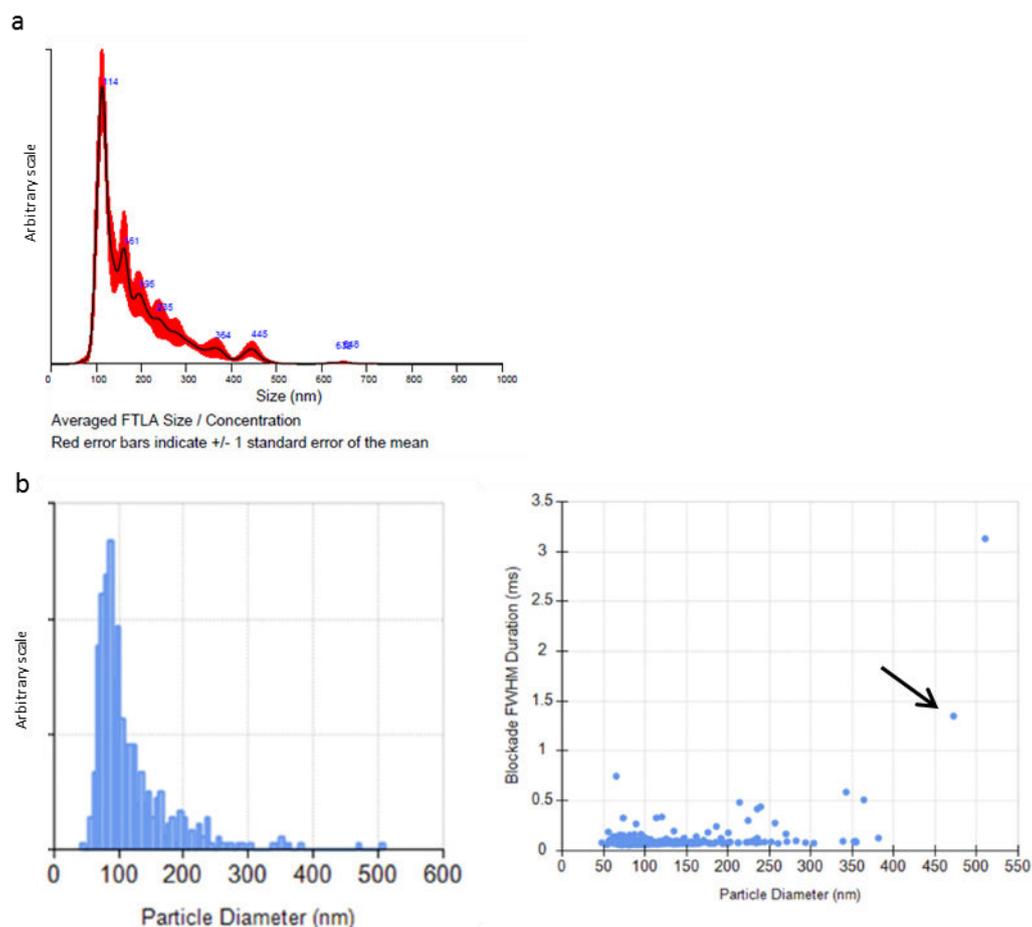


Figure 23 : Spectres de la distribution de taille des VE de la série d'expérimentations 4. a) Analyse par NTA. b) Analyse par qNano.

Les VE de la série d'expérimentations 2 et 4 ont aussi été caractérisées par ELISA contre le CD9, un marqueur de surface spécifique aux exosomes. Cette technique, plus sensible et spécifique que ces deux dernières, permet de s'assurer que les particules récupérées par ultracentrifugation sont bien des exosomes et non des molécules interférentes qui auraient le même aspect et la même taille aux NanoSight et qNano. Selon deux préparations de VE, les Pg-CSEh libéreraient en moyenne 1 748 exosomes en 48 heures (Tableau 4). Ce rendement, légèrement plus élevé que celui trouvé par le NanoSight et le qNano, pourrait s'expliquer par la formation d'agrégats observés au qNano qui sous-estimeraient la quantité de VE contenues dans les échantillons ou par une meilleure sensibilité du test ELISA par rapport aux deux autres techniques.

Afin d'observer la forme et l'aspect des VE, les VE des séries d'expérimentations 2c et 4 ont été analysées par cryo-MET. De nombreuses particules, principalement de forme circulaire, ont été identifiées et sont de la taille des exosomes (Figure 24b et c), des MP (Figure 24d) ; de grandes particules multivésiculaires pourraient correspondre à des corps apoptotiques (Figure 24a). Tout comme le test ELISA, la cryo-MET permet de confirmer la présence de VE dans les différentes préparations de VE isolées par ultracentrifugation. L'avantage supplémentaire de cette technique est de confirmer l'intégrité des VE ; l'ultracentrifugation semble ne pas détériorer les VE bien qu'elles soient soumises à une très forte vitesse pour les faire culoter. Cette méthode peut être quantitative mais les VE n'ont pas été comptabilisées par cryo-MET dans cette étude.

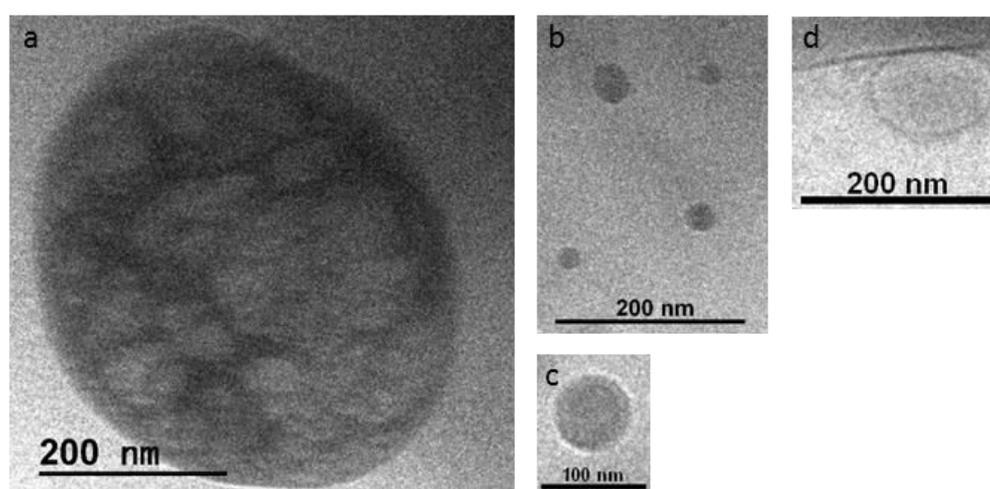


Figure 24 : Visualisation des VE des séries d'expérimentations 2c et 4 par cryo-MET.

Pour s'assurer que la caractérisation des VE dérivées des Pg-CSEh n'est pas biaisée par la présence de VE issues du milieu de culture (α MEM + sérum B27, filtré à 0,2 μ m), du milieu seul a été ultracentrifugé dans les mêmes conditions que le MC contenant les VE (99 855 g). Après 16 heures d'ultracentrifugation, aucun culot de VE n'a été observé mais le fond du type a été rincé avec du PBS 1X et la suspension a été analysée par NanoSight. Bien que quelques particules soient visibles à l'écran, la quantité de VE est bien en-dessous de la quantité minimale requise pour une bonne acquisition. La quantité de VE présentes dans le milieu vierge est donc négligeable et ne devrait donc pas affecter les mesures de concentration des VE dans les différentes préparations.

3. Etude de l'effet thérapeutique des vésicules extracellulaires *in vivo*

a) Analyse de la fonction cardiaque chez les souris ICC

Pour la série 1, 120 souris ont été infarctées. Parmi elles, 54 ont survécu et ont été incluses dans l'étude ; les autres sont décédées dans les suites immédiates de la chirurgie ou plus à distance du fait de leur ICC, ou ont été exclues car leur FE n'était pas dans la fourchette des valeurs prédéfinies. Quatorze souris ont reçu les Pg-CSEh fraîchement triés (injection de 500 000 cellules par souris) et 19 ont reçu l' α MEM (contrôles). Six semaines plus tard, 12 souris ayant reçu les Pg-CSEh et 18 souris ayant reçu l' α MEM avaient survécu et l'efficacité du traitement a pu être évaluée par échocardiographie (Figure 25).

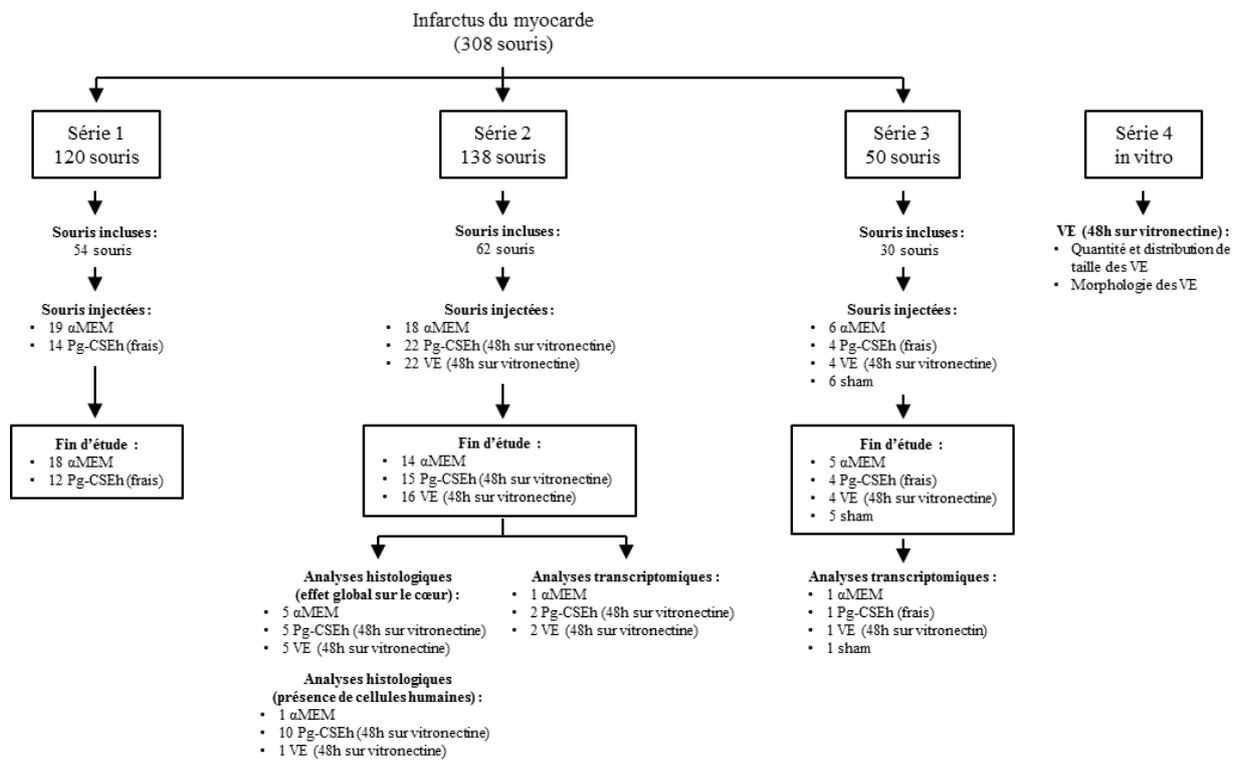


Figure 25 : Les différentes séries d'expérimentations regroupant trois séries *in vivo* et une série *in vitro*.

Il apparaît ainsi que le traitement par Pg-CSEh entraîne une amélioration significative de la fonction cardiaque alors que cette amélioration n'est que modérée chez les souris contrôles (Figure 26). En effet, dans le groupe traité par les Pg-CSEh, le VTS diminue de $5.4 \mu\text{L} \pm 1.7 \mu\text{L}$ entre le début et la fin de l'étude (diminution de 10.2% en pourcentage de t_0) alors que chez les souris contrôles, le VTS diminue de $3.4 \mu\text{L} \pm 1.5 \mu\text{L}$ (diminution de 6.4%). Cette tendance

est retrouvée pour le VTD mais ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs avec une diminution de $3.3 \mu\text{L} \pm 1.2 \mu\text{L}$ chez les souris traitées avec les Pg-CSEh (3.6%) et une plus faible diminution de $1.9 \mu\text{L} \pm 0.5 \mu\text{L}$ chez les souris contrôles (2.0%). La FE est augmentée de manière significative de $3.8\% \pm 1.7\%$ (10.2%) et de $3.0\% \pm 1.8\%$ (8.4%) chez les souris traitées et contrôles, respectivement. Ces résultats confirment l'efficacité thérapeutique des Pg-CSEh préparés selon notre protocole et dans notre modèle d'ICC, malgré une faible différence statistique par rapport au groupe contrôle. Aucune comparaison intergroupe n'a pu être effectuée car la répartition aléatoire des souris avant l'administration des traitements a entraîné des valeurs échographiques pré-greffes significativement différentes entre les groupes.

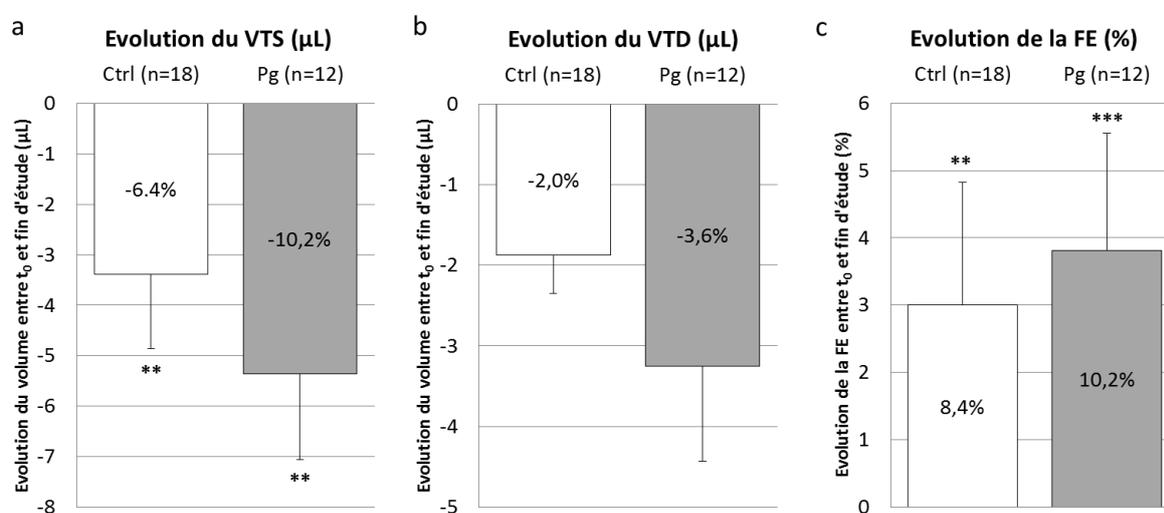


Figure 26 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh par rapport aux souris contrôles de la série d'expérimentations 1. a) Evolution du VTS en microlitres. b) Evolution du VTD en microlitres. c) Evolution de la FE en pourcentage. Les étiquettes à l'intérieur des barres des graphiques représentent l'évolution en pourcentage de t₀. **p < 0.01. ***p < 0.001.

Pour la série 2, l'artère coronaire antérieure gauche de 138 souris a été ligaturée de façon permanente. Soixante-deux souris ont été incluses dans l'étude : 22 souris ont reçu les Pg-CSEh cultivés pendant 48 heures sur vitronectine (injection de 500 000 Pg-CSEh), 22 souris ont reçu les VE dérivées de ces mêmes Pg-CSEh (VE libérées par 500 000 Pg-CSEh) et 18 souris ont reçu l' α MEM (contrôles). Deux animaux, tous deux dans le groupe contrôle, ont été exclus de l'étude car ils présentaient des valeurs fonctionnelles de base aberrantes (supérieures à deux écart-types à la moyenne). A la fin de l'étude, les souris restantes soit 15 souris traitées avec les Pg-CSEh, 16 avec les VE et 14 avec l' α MEM ont été échographiées afin d'évaluer l'efficacité du traitement (Figure 25).

Six semaines après les injections, les souris contrôles améliorent leur fonction cardiaque avec une diminution du VTS de $2.7 \mu\text{L} \pm 1.5 \mu\text{L}$ (4.1%), une diminution du VTD de $2.5 \mu\text{L} \pm 1.2 \mu\text{L}$ (3.0%) et une augmentation significative de la FE de $2.3\% \pm 0.8\%$ (6.7%) qui résulte seulement de la diminution parallèle des volumes (Figure 27). En revanche, la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh et leurs VE est améliorée de façon significative et identique dans les deux groupes. Dans le groupe Pg-CSEh, le VTS diminue de $4.2 \mu\text{L} \pm 1.0 \mu\text{L}$ (7.5%), le VTD diminue de $4.5 \mu\text{L} \pm 1.5 \mu\text{L}$ (4.4%) et la FE augmente de $2.2\% \pm 0.6\%$ (5.4%). De même, dans le groupe traité par les VE dérivées de ces mêmes Pg-CSEh, les VTS et VTD diminuent respectivement de $5.7 \mu\text{L} \pm 1.2 \mu\text{L}$ (9.2%) et de $4.3 \mu\text{L} \pm 1.3 \mu\text{L}$ (4.4%) et la FE augmente de $2.8\% \pm 0.8\%$ (8.1%).

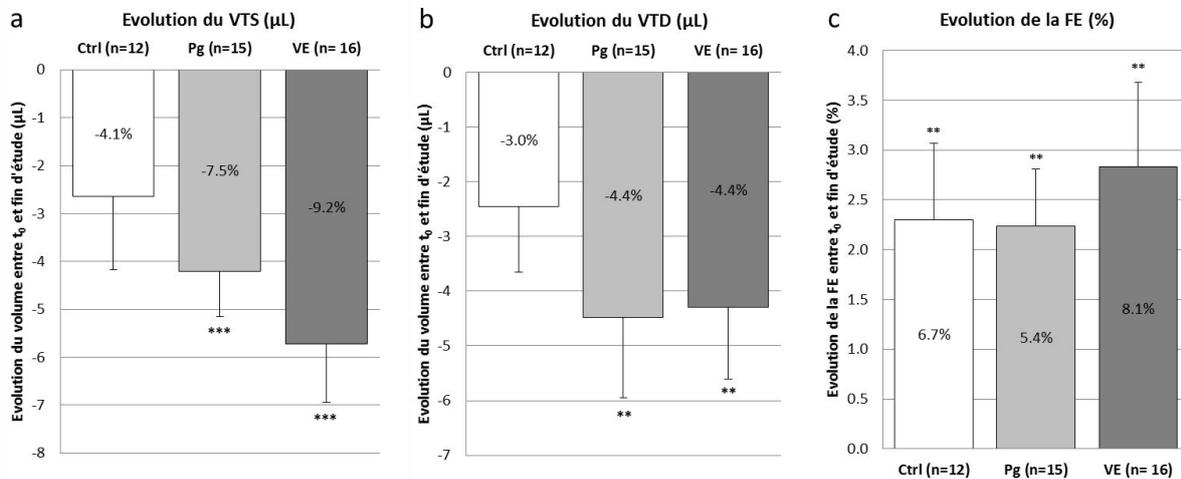


Figure 27 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine pendant 48h, les VE qui en sont dérivées et l'aMEM en tant que contrôle de la série d'expérimentations 2. a) Evolution du VTS en microlitres. b) Evolution du VTD en microlitres. c) Evolution de la FE en pourcentage. Les étiquettes à l'intérieur des barres des graphiques représentent l'évolution en pourcentage de t_0 . ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Les Pg-CSEh de la série 2 étant cultivés sur vitronectine pendant 48 heures pour en récupérer les VE, leur phénotype diffère peut-être de celui des Pg-CSEh fraîchement injectés de la série 1. Une comparaison de leur potentiel thérapeutique est alors effectuée. L'amélioration fonctionnelle cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh fraîchement triés de la série 1 n'est pas significativement différente de l'amélioration fonctionnelle cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine pendant 48 heures de la série 2, que ce soit pour le VTS, le VTD ou la FE (Figure 28).

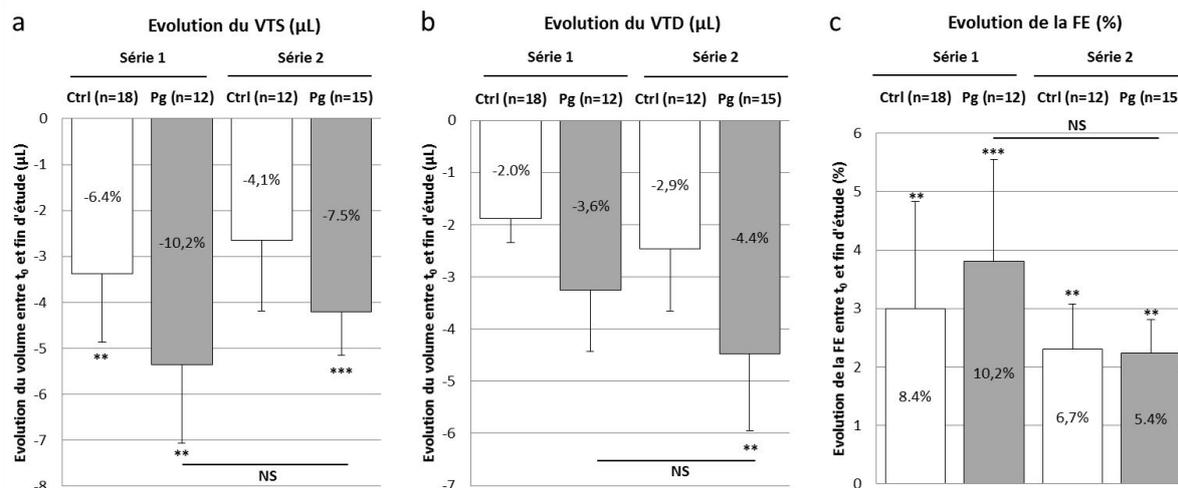


Figure 28 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh par rapport aux souris contrôles de la série d'expérimentations 1 et 2. a) Evolution du VTS en microlitres. b) Evolution du VTD en microlitres. c) Evolution de la FE en pourcentage. Les étiquettes à l'intérieur des barres des graphiques représentent l'évolution en % de t_0 . ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

b) Analyses histologiques et immuno-histochimiques

Dans la série 2, les souris sont réparties en deux groupes d'analyse après avoir été échographiées : analyses histologiques et immuno-histochimiques du cœur comprenant 5 souris de chaque groupe de traitement et analyses transcriptomiques.

La répartition aléatoire des souris dans les différents groupes de traitement ayant conduit à des différences significatives intergroupes avant les injections, 5 souris de chaque groupe présentant des valeurs de base similaires ont été sélectionnées pour permettre une comparaison intergroupe valide. Les souris traitées avec les Pg-CSEh ont tendance à avoir un infarctus plus petit que les souris contrôles et celles traitées avec les VE (Figure 29a). En ce qui concerne la fibrose, deux types d'analyse ont été réalisés : une analyse de la fibrose globale du cœur et une analyse de la fibrose en zone non-infarctée afin d'observer si la fibrose de la zone infarctée s'étend au myocarde sain. Les souris traitées avec les CSE-Pg et les VE ont tendance à avoir globalement moins de fibrose (Figure 29b) que les souris contrôles et la zone non-infarctée ne semble pas être affectée (Figure 29d). Le nombre d'artéριοles dans la zone péri-infarctée ne semble pas différer non plus entre les 3 groupes de traitement (Figure 29c). Les souris traitées avec les CSE-Pg et les VE ont tendance à avoir des CM plus petits (Figure 29f). Les souris traitées avec les VE ont significativement plus de capillaires par CM par rapport aux souris

contrôles et à celles traitées avec les Pg-CSEh, ce qui suggère un effet pro-angiogénique des VE (Figure 29e).

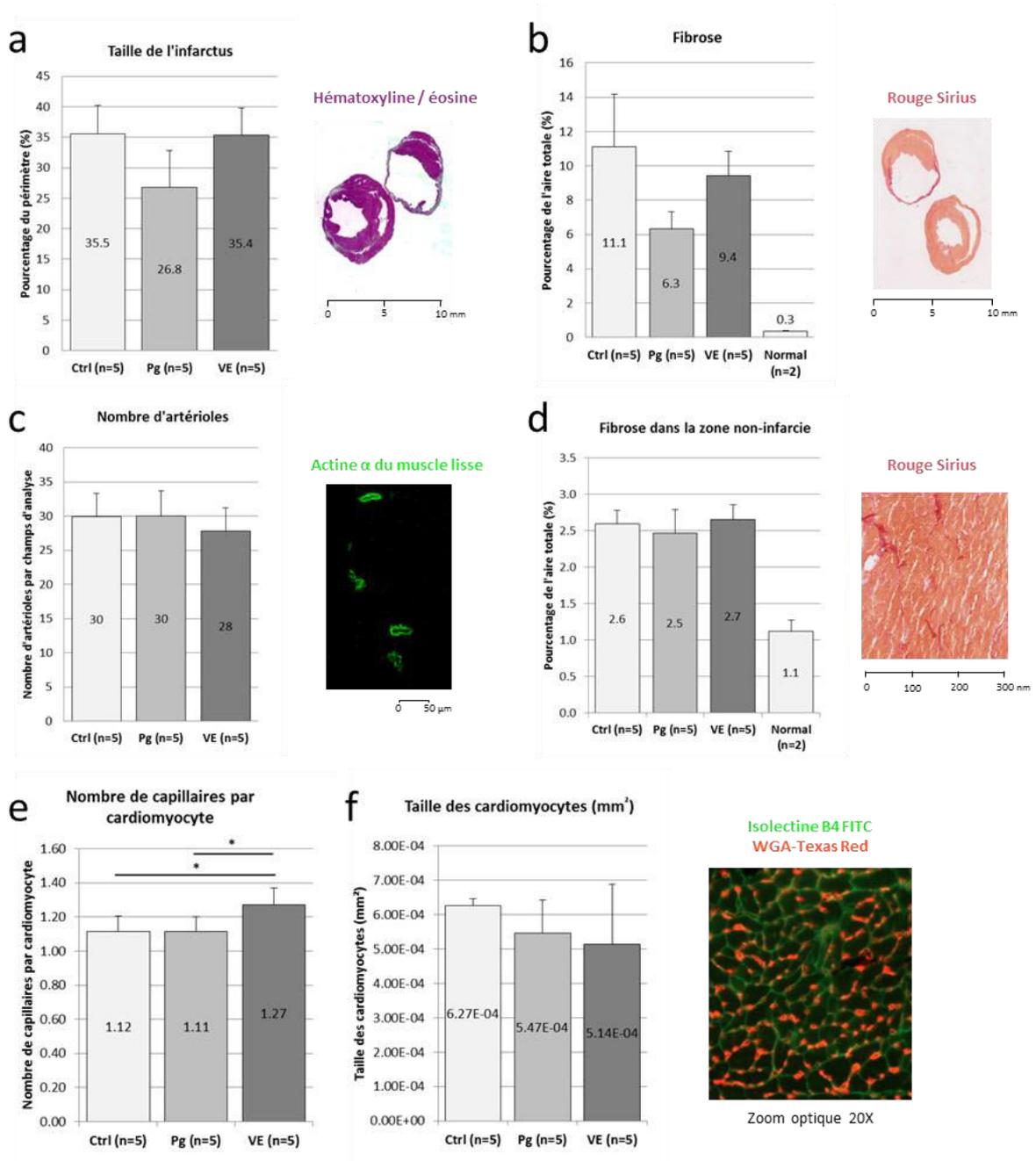


Figure 29 : Analyses histologiques et immuno-histochimiques des coeurs de souris traitées avec les Pg-CSEh, les VE qui en sont dérivées et l'aMEM en tant que contrôle. Chaque graphique est accompagné d'une image représentative du marquage ou de la coloration. * $p < 0.05$.

De plus, des analyses immuno-histochimiques complémentaires ont été réalisées afin de déterminer si les cellules transplantées persistent dans le myocarde jusqu'à la fin de l'étude (10

souris traitées avec les Pg-CSEh, 1 souris traitée avec les VE et une souris avec l' α MEM). Les cœurs des souris ont été entièrement coupés de manière à analyser différentes sections du cœur pour augmenter la probabilité de trouver des cellules transplantées. Au total, 24 sections différentes du cœur ont été marquées avec l'Ac anti-lamine A/C humaine. Des coupes de Pg-CSEh enrobés dans un patch de fibrine greffé sur le cœur de rats présentant une ICC ont aussi été marquées pour servir de contrôles positifs. Bien que des cellules humaines aient été identifiées dans les contrôles positifs, aucune cellule humaine n'a été détectée sur les coupes analysées, suggérant que les cellules greffées dans le cœur par injections transcutanées ne persistent pas dans le myocarde six semaines après le traitement.

L'analyse fonctionnelle cardiaque de ce groupe réduit de souris sélectionnées (n=5 par groupe), présentant des valeurs pré-injections similaires, montre les mêmes améliorations fonctionnelles cardiaques chez les souris traitées avec les Pg-CSEh et les VE, bien que certains paramètres ne soient pas significatifs du fait du faible nombre de souris par groupe. En effet, les souris traitées avec les VE ont une diminution du VTS de $7,8 \mu\text{L} \pm 2,8 \mu\text{L}$, une diminution significative du VTD de $7,0 \mu\text{L} \pm 2,3 \mu\text{L}$ et une augmentation de la FE de $3,5\% \pm 2,6\%$ (Figure 30).

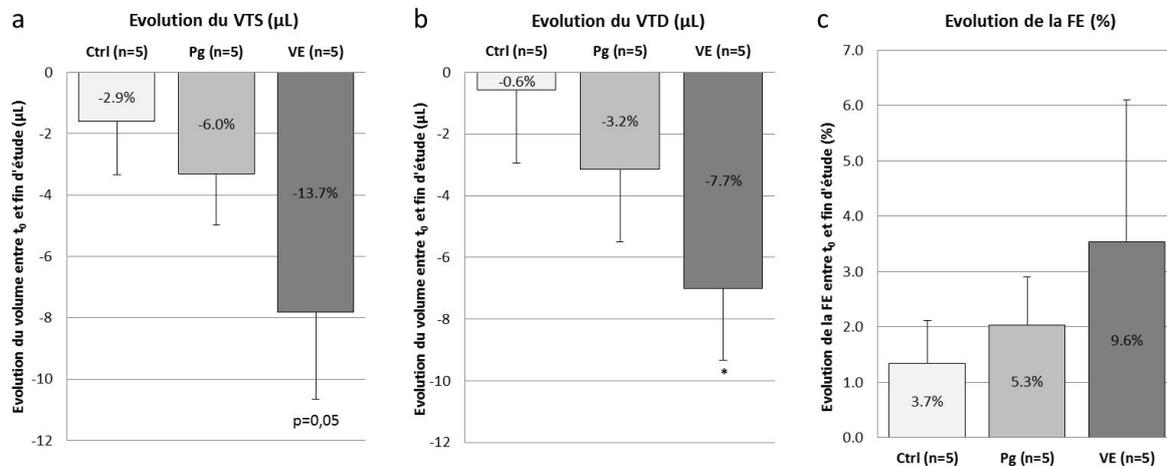


Figure 30 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine pendant 48h, les VE qui en sont dérivées et l' α MEM en tant que contrôle de la série d'expérimentations 2. a) Evolution du VTS en microlitres. b) Evolution du VTD en microlitres. c) Evolution de la FE en pourcentage. Les étiquettes à l'intérieur des barres des graphiques représentent l'évolution en % de t_0 . * $p < 0.05$.

c) Analyses transcriptomiques

L'analyse des profils d'expression de gènes porte sur des animaux des séries 2 et 3 (Figure 25) :

- La série d'expérimentations 2 comprend 5 cœurs de souris avec des valeurs fonctionnelles cardiaques pré-injections similaires : 2 souris traitées avec les Pg-CSEh, 2 souris traitées avec les VE et 1 souris contrôle injectée avec l' α MEM,
- Sur les 30 souris incluses dans la série d'expérimentations 3, 4 d'entre elles ont été injectées avec les Pg-CSEh fraîchement triés (injection de 300 000 Pg-CSEh), 4 ont été traitées par les VE dérivées des Pg-CSEh cultivés sur vitronectine (VE libérées par 300 000 Pg-CSEh), 5 ont reçu des injections de milieu α MEM (contrôles) et 5 ont subi une ouverture/fermeture du thorax (*sham*). Une souris de chacun de ces groupes, soit 4 souris, comparables par la similitude de leurs valeurs échographiques pré-injections, ont été sélectionnées pour l'analyse des profils d'expression de gènes.

L'analyse bio-informatique non-supervisée révèle l'expression différentielle des gènes de chaque souris en fonction de 3 composantes principales (PC1, PC2 et PC3). Les souris, chacune représentée par un ballon, ont été analysées en fonction des séries d'expérimentation 2 et 3 afin d'observer leur répartition (Figure 31). Les graphiques montrent que les souris des séries d'expérimentations 2 et 3 forment deux groupes distincts indiquant que toutes les souris de la série 3 ont un niveau d'expression des gènes associés à la PC1 plus élevé que les souris de la série 2. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les souris de la série 3 ont une meilleure fonction cardiaque pré-greffe que les souris de la série 2.

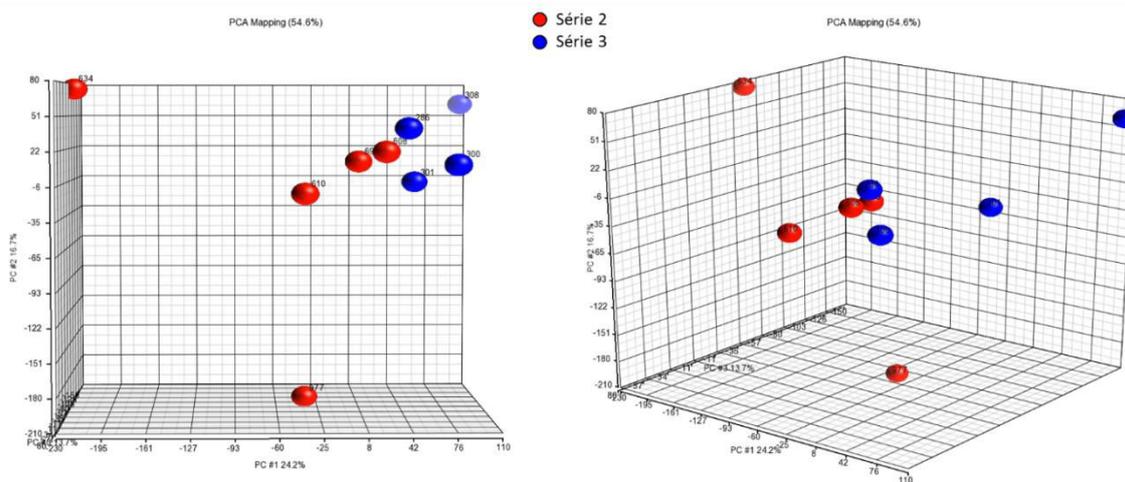


Figure 31 : Représentations graphiques de l'analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cœurs de souris six semaines post-traitement en fonction de 3 composantes principales PC1, PC2 et PC3 pour chaque série d'expérimentations.

Dans un deuxième temps, la représentation graphique a été analysée en fonction des groupes de traitement (Figure 32a). Dans la série 2, une observation intéressante est que les gènes associés à la PC1 sont surexprimés chez les souris traitées avec les Pg-CSEh et les VE par rapport à la souris contrôle (Figure 32b). Cette constatation est aussi retrouvée chez les souris de la série d'expérimentations 3. La deuxième analyse, dite supervisée, a ainsi identifié 927 gènes fortement corrélés à la PC1 différentiellement exprimés chez les souris traitées par rapport aux souris contrôles (coefficient de Pearson de 0.8 à 1.0, tableau de l'article de l'Annexe 2, à consulter en ligne). Une différence plus importante est observée dans la série 2 entre les souris traitées avec les Pg-CSEh et les VE et la souris contrôle que dans la série 3. Cela pourrait s'expliquer par le fait que 1) l'amélioration de la fonction cardiaque après l'administration d'un traitement est d'autant plus marquée que la fonction cardiaque pré-greffe de la souris est fortement dégradée ou 2) les souris de la série 3 ont été traitées avec une quantité plus faible de Pg-CSEh (300 000 Pg-CSEh). Une carte thermique (*heatmap*) reflétant l'expression de ces 927 gènes chez les souris de la série d'expérimentations 2 illustre cette différence drastique entre les souris traitées avec les Pg-CSEh ou les VE et les souris contrôles (Figure 32c).

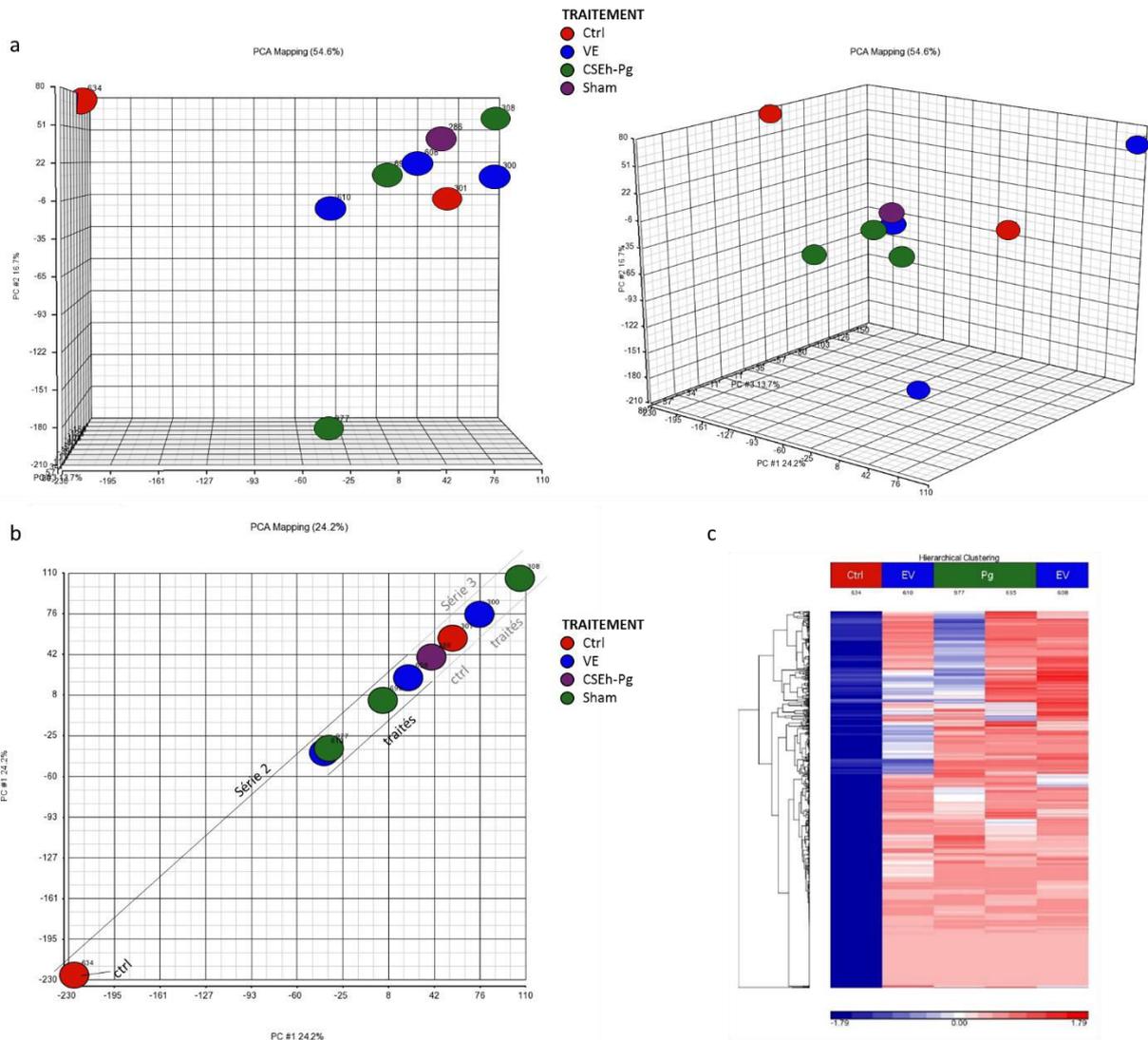


Figure 32 : a) Représentations graphiques de l'analyse des gènes différemment exprimés dans les cœurs de souris six semaines post-traitement en fonction de 3 composantes principales PC1, PC2 et PC3. b) Représentation graphique de l'analyse des gènes différemment exprimés dans les cœurs de souris six semaines post-traitement corrélés à la PC1. c) Cartographie de l'expression de 927 gènes corrélés à la PC1 (heatmap) des souris de la série d'expérimentations 2.

Le logiciel Ingenuity Pathway a démontré que ces 927 gènes sont associés à 669 processus biologiques significativement enrichis ($p < 0.05$). Parmi ces fonctions biologiques, 49 d'entre elles, impliquant 418 gènes surexprimés, sont retenues comme étant impliquées dans l'IC et la réparation cardiaque. Elles sont classées manuellement en 5 grandes catégories : fibrose, IC (incluant les voies de signalisation associées à l'IDM et à l'hypertrophie), réparation de l'ADN, cycle cellulaire et survie cellulaire. Pour chaque fonction biologique, le z-score est utilisé pour déterminer si la fonction est prédite pour être activée ou désactivée, et conduit finalement à un effet bénéfique ou délétère pour le cœur en ICC (Tableau 5). Ici, les résultats montrent les

fonctions prédites chez les souris traitées avec les VE par rapport aux souris contrôles. La série d'expérimentations 2 a été choisie car elle est celle où il y a la plus grande différence entre les souris traitées et les souris contrôles.

FONCTIONS

Résultat prédit	Catégorie	Nombre de fonctions biologiques impliquées	Nombre de gènes distincts	Fonctions biologiques	Détails de la fonction biologique impliquée	Enrichissement de la fonction biologique : p-Value	Prédiction de l'état d'activation de la fonction biologique	z-score du groupe traité avec les VE	Nombre de gènes
Bénéfique	Anti-fibrotic	3	41	Cell Death and Survival	apoptosis of fibroblasts	1.69E-04		0.179	21
				Cell Cycle, Cellular Development, Connective Tissue Development and Function	senescence of fibroblast cell lines	6.40E-03		0.521	10
				Cell Death and Survival	apoptosis of fibroblast cell lines	1.21E-02	Increased	2.253	24
	Prevention of heart failure	1	6	Cardiovascular System Development and Function, Organ Morphology	dilation of heart ventricle	1.45E-02		-0.896	6
	Promotes DNA repair	9	187	Cellular Compromise, DNA Replication, Recombination, and Repair	degradation of chromosomes	3.87E-04		-0.555	5
				DNA Replication, Recombination, and Repair	metabolism of DNA	6.70E-04		0.17	33
				DNA Replication, Recombination, and Repair	DNA replication	2.91E-05		0.232	26
				DNA Replication, Recombination, and Repair	homologous recombination repair of DNA	7.94E-04		0.692	6
				Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance, DNA Replication, Recombination, and Repair	double-stranded DNA break repair of cells	5.46E-06		0.795	11
				DNA Replication, Recombination, and Repair	double-stranded DNA break repair	2.53E-10		1.532	23
				Gene Expression	transcription of DNA	2.10E-13	Increased	2.446	148
				Gene Expression	activation of DNA endogenous promoter	4.50E-12	Increased	2.577	120
				DNA Replication, Recombination, and Repair	repair of DNA	7.99E-09	Increased	4.038	36
	Promotes cell cycle	10	119	Cell Cycle	G1 phase	6.55E-03		1.219	28
				Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance	repair of cells	4.41E-05		1.382	12
				Cell Cycle	S phase	1.11E-02		1.656	19
				Cell Cycle	G2/M phase	1.03E-03		1.664	19
				Cell Cycle	G2 phase	4.17E-03		1.664	21
				Cell Cycle	mitosis	5.35E-03		1.804	34
				Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair	S phase checkpoint control	5.74E-03		1.982	4
				Cell Cycle	interphase	5.89E-06	Increased	2.299	56
				Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair	checkpoint control	4.15E-03	Increased	2.607	10
				Cell Cycle	cell cycle progression	5.02E-07	Increased	3.282	85
	Promotes cell survival	12	362	Organismal Survival	organismal death	3.04E-07	Decreased	-12.869	182
				Developmental Disorder	Growth Failure	9.39E-03	Decreased	-6.443	44
				Cell Death and Survival	cell death	1.30E-02	Decreased	-4.247	197
				Cell Death and Survival	apoptosis	5.39E-04	Decreased	-4.01	168
				Cell Death and Survival	necrosis	9.71E-03	Decreased	-2.894	157
				Cell Cycle	senescence of cells	3.50E-05		-1.219	25
				Cell Death and Survival, Cellular Function and Maintenance	colony survival of cells	1.77E-02		0.152	5
				Organismal Survival	viability	3.56E-03	Increased	2.359	10
				Organismal Development	growth of organism	4.83E-04	Increased	3.818	62
				Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	9.44E-05	Increased	5.208	231
				Cell Death and Survival	cell viability	1.51E-03	Increased	5.409	85
				Cell Death and Survival	cell survival	1.94E-03	Increased	5.726	88
				Cell Death and Survival	cell death of fibroblasts	2.12E-04		-0.113	24
Délétère	Pro-fibrotic	3	49	Cell Death and Survival, Connective Tissue Development and Function	cell viability of fibroblasts	1.33E-04		0.954	12
				Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Connective Tissue Development and Function, Tissue Development	proliferation of fibroblasts	8.41E-04	Increased	2.058	27
				Developmental Disorder	hypertrophy of tissue	1.85E-02		0.962	16
	Transition to heart failure	3	16	Cardiovascular Disease, Developmental Disorder, Organismal Injury and Abnormalities, Skeletal and Muscular Disorders	hypertrophy of cardiomyocytes	4.47E-03		1.414	10
				Cardiovascular Disease, Developmental Disorder, Organismal Injury and Abnormalities, Skeletal and Muscular Disorders	hypertrophy of cardiac muscle	9.78E-03		1.549	11

VOIES DE SIGNALISATION CANONIQUES

Résultat prédit	Catégorie	Nombre de fonctions biologiques impliquées	Nombre de gènes distincts	Ingenuity Canonical Pathways	Enrichissement de la fonction biologique : p-Value	Ratio	z-score du groupe traité avec les VE	Nombre de gènes
Bénéfique	Promotes DNA repair	1	16	Role of BRCA1 in DNA Damage Response	7.31	2.05E-01	2.53	16
	Promotes cell cycle	2	16	Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	3.07	1.41E-01	0.447	9
				Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	4.31	1.82E-01	1.134	10
Délétère	Transition to heart failure	2	29	Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	5.65	1.23E-01	3.441	22
				Cardiac Hypertrophy Signaling	4.6	1.03E-01	4.379	23
	Reduces cell cycle	1	8	Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	3.22	1.63E-01	-0.378	8
	Reduces cell survival	2	10	Apoptosis Signaling	1.62	8.99E-02	0.378	8
			Death Receptor Signaling	1.55	8.70E-02	1.414	8	

Tableau 5 : Les 49 fonctions biologiques pertinentes enrichies dans le groupe de souris traitées avec les VE par rapport à la souris contrôle de la série d'expérimentations 2, ainsi que la p-value, le z-score et le nombre de gènes impliqués pour chaque fonction biologique.

Par exemple, la fonction « dilatation du cœur » est prédite comme étant désactivée chez les souris traitées avec les VE par rapport à la souris contrôle et est basée sur l'expression différentielle de 6 gènes ; cette prédiction mène à un effet bénéfique pour le cœur. A l'inverse, la fonction biologique « hypertrophie du tissu » est prédite comme étant activée chez les souris traitées avec les VE par rapport à la souris contrôle et est basée sur l'expression de 16 autres gènes différentiellement exprimés ; cette prédiction mène à un effet délétère pour le cœur. Ces deux fonctions biologiques sont classées dans la catégorie de l'IC. Globalement, les données montrent que les fonctions biologiques associées aux gènes différentiellement exprimés chez les souris traitées avec les VE par rapport à la souris contrôle prédisent principalement des effets bénéfiques (78% des fonctions biologiques). Ces effets impliquent une augmentation de la survie cellulaire (25%), de la prolifération cellulaire (25%) et de la réparation de l'ADN (20%), mais aussi la diminution de la fibrose (6%) et de la progression de l'IC (2%) (Figure 33). Etant donné que les niveaux d'expression de ces 927 gènes sont similaires entre les souris traitées avec les VE et les Pg-CSEh, cette prédiction s'applique sans doute aussi à ces dernières.

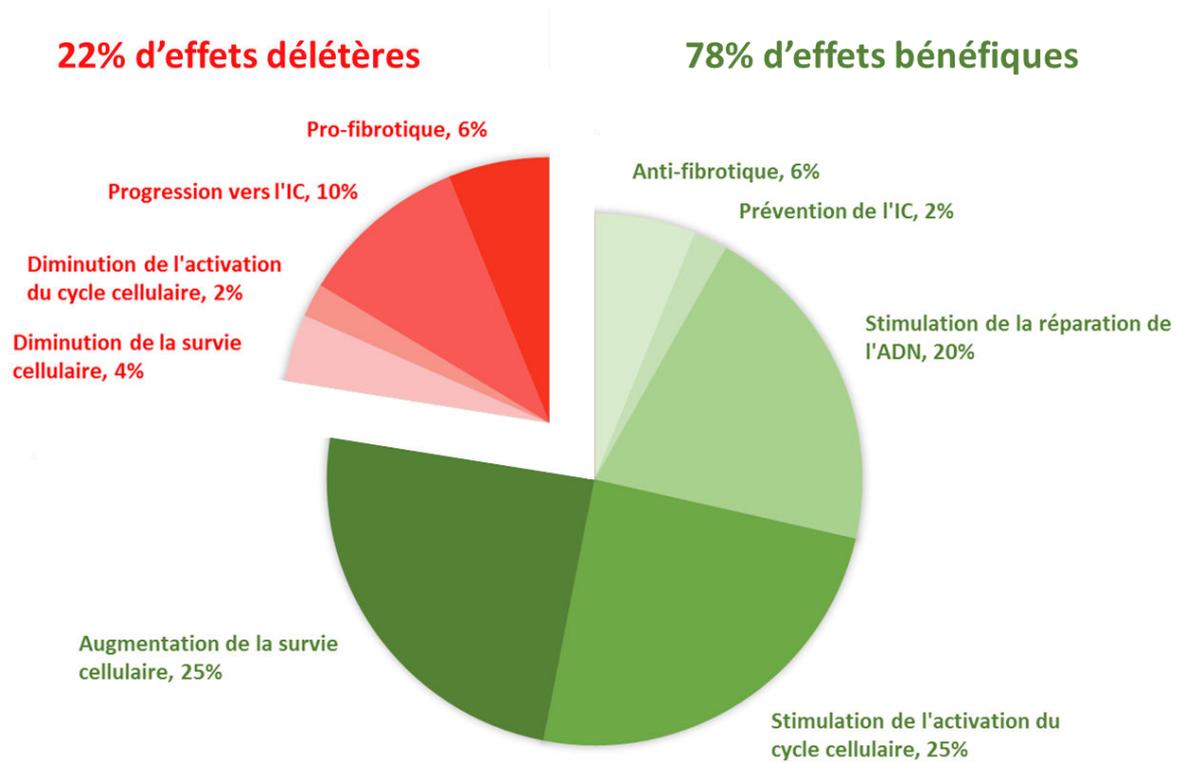


Figure 33 : Graphique en secteur représentant les fonctions biologiques pertinentes les plus enrichies prédites pour conduire à un effet bénéfique (vert) ou délétère (rouge) chez les souris traitées avec les VE par rapport aux souris contrôles.

4. Suivi des vésicules extracellulaires après injections intra-myocardiques

La fluorescence des VE marquées respectivement au DiR et au DiD a été analysée par le Photon Imager RT afin de choisir le meilleur marqueur pour le suivi des VE. Le marqueur DiD a été retenu car les VE montrent une meilleure fluorescence, plus intense et plus spécifique, tandis que le DiR doit être surexposé, engendrant un bruit de fond considérable de fluorescence (Figure 34).

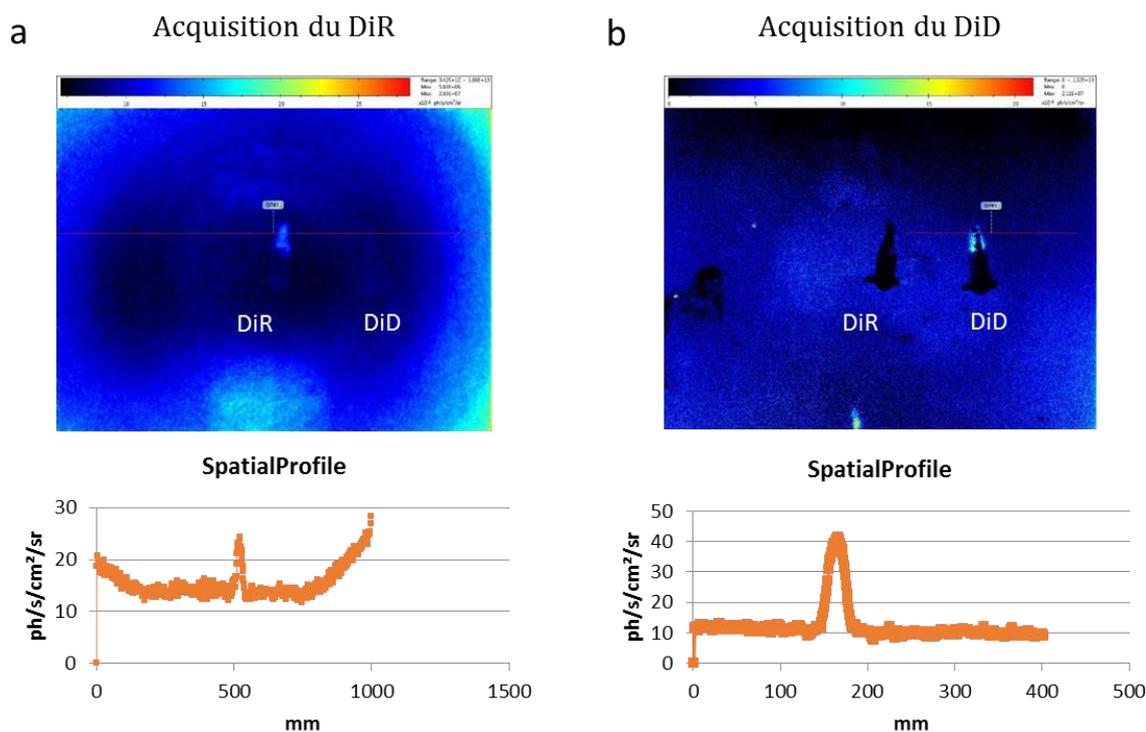


Figure 34 : Evaluation de la fluorescence des VE marquées au DiR (a) et au DiD (b) par le Photon Imager RT.

Les VE marquées au DiD sont injectées dans le myocarde péri-infarci de souris présentant une ICC. Vingt-six heures plus tard, le cœur est prélevé et analysé au Photon Imager RT (Figure 35). Un signal fluorescent est observé aux sites des injections dans la région péri-infarci atteignant $9,08 \cdot 10^{11}$ ph/s/sr. Un dosage BCA est réalisé afin de quantifier cette fluorescence en fonction de la quantité de VE injectée : 0,855 μ g de VE ont été injectées à la souris, correspondant ainsi à 7,76 ph/h/sr/ μ g de VE injectées. La technique d'injections transcutanées guidées par échographie est ainsi validée par cette expérience.

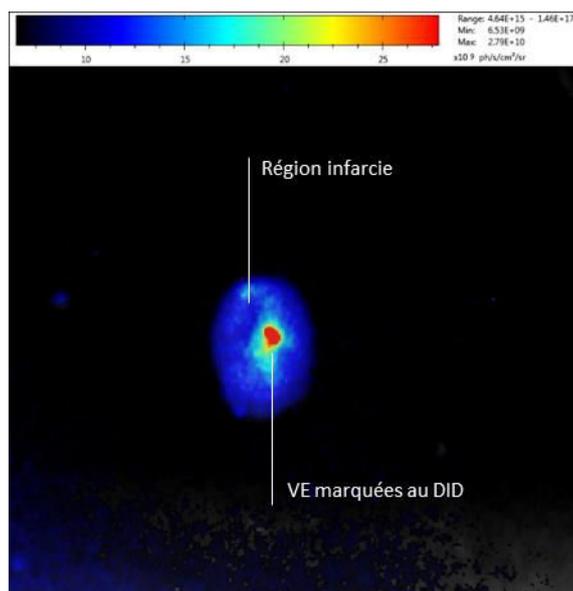


Figure 35 : Visualisation de l'injection des VE marquées au DiD en région péri-infarctie par le Photon Imager RT.

5. Analyse des miARN des vésicules extracellulaires

Après tri magnétique des Pg-CSEh, leur pureté et leur viabilité ont été analysées comme précédemment par CMF avant d'être incorporés dans des patches de fibrine (Tableau 6). Les résultats montrent une bonne reproductibilité entre les deux tris avec une pureté en moyenne de 97.9% et une viabilité de 98.9%.

	Pureté	Viabilité (7AAD -)
Pg-CSEh du Patch 1	99,97%	98,99%
Pg-CSEh du Patch 2	95,77%	98,70%

Tableau 6 : Pureté et viabilité des Pg-CSEh après tri magnétique.

Après extraction des ARN totaux des VE provenant des Pg-CSEh inclus dans des patches de fibrine pendant 24 heures, l'analyse des miARN a été effectuée en collaboration avec le laboratoire de Mark Mercola et Alexandre Colas du Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute à La Jolla, Californie, USA. Au total, 800 miARN ont été étudiés par Nanostring. Les deux échantillons de VE donnent des résultats similaires ce qui montre la reproductibilité de la méthode. Parmi les familles de miARN les plus représentées, la famille du miR-302 arrive en tête (61% des miARN totaux en moyenne) suivie de la famille du miR-

17 qui représente en moyenne 10% des miARN totaux (Figure 36). Les autres miARN correspondent à ceux dont leur expression est inférieure à 0,3% des miARN totaux.

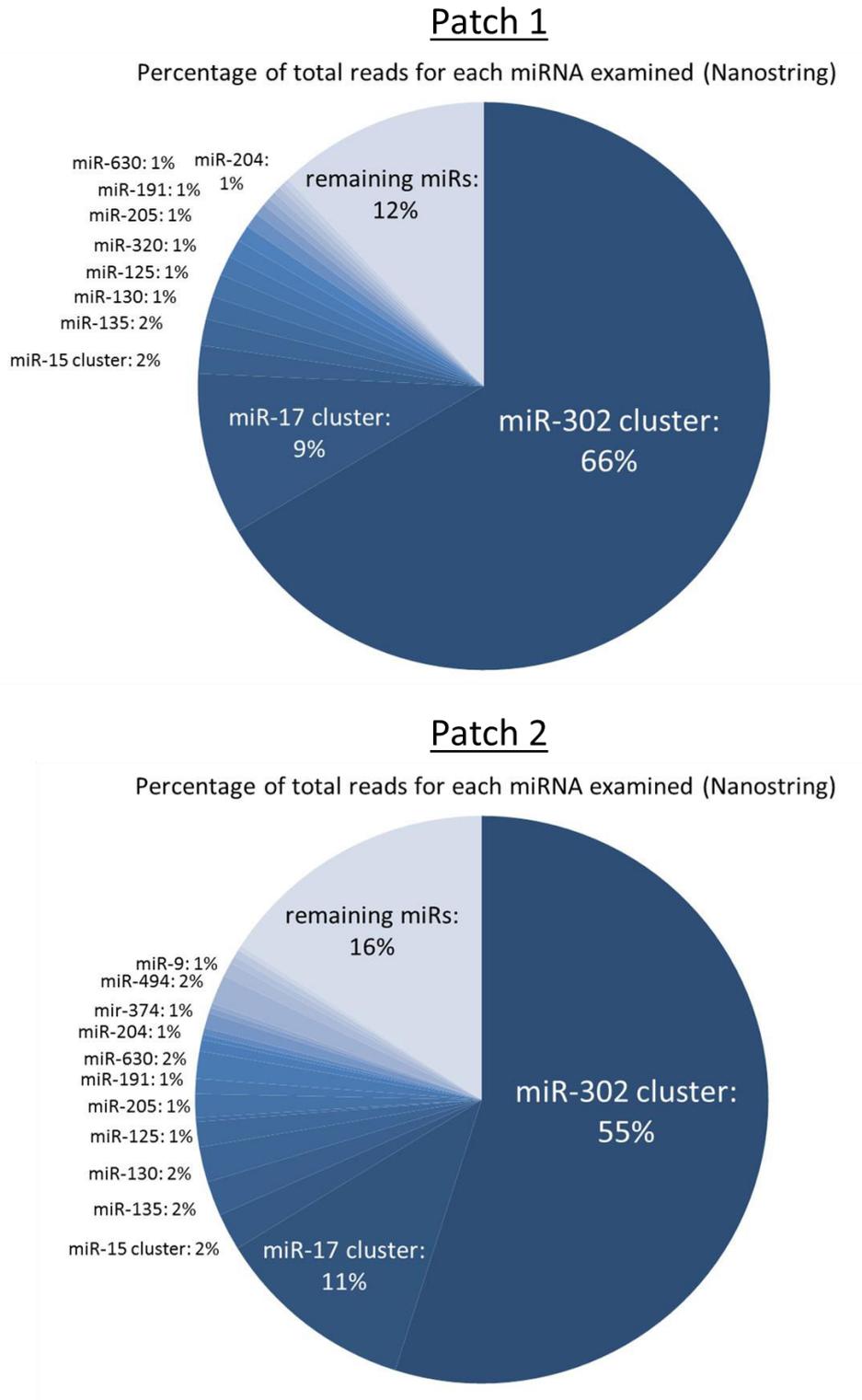


Figure 36: Proportions des miARN contenus dans les VE issues des Pg-CSEh incorporés dans un patch de fibrine (miR : miARN).

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

Les objectifs de la première partie du projet de thèse ont été la caractérisation *in vitro* des VE dérivées de Pg-CSEh puis la comparaison de l'efficacité thérapeutique des Pg-CSEh avec les VE qui en sont dérivées dans un modèle animal d'ICC. La validation de la non-infériorité de l'effet thérapeutique des VE par rapport aux Pg-CSEh permettrait d'envisager la seule administration des VE dans le traitement de l'ICC.

Les Pg-CSEh ont été obtenus par tri magnétique et cultivés sur vitronectine pendant 48 heures. Leur caractérisation en sortie de tri par CMF a montré une bonne viabilité et une bonne pureté des cellules sur l'ensemble des tris réalisés. Les qPCR ont confirmé leur identité phénotypique puisqu'ils expriment les marqueurs cardiovasculaires précoces tels que ISL1 et MEF2C mais n'expriment plus les marqueurs de pluripotence SOX2 et NANOG. En revanche, leur culture sur vitronectine s'est révélée non adaptée pour ce type cellulaire puisqu'elle a entraîné une forte mortalité des cellules au terme des 48 heures bien que le phénotype des cellules soit maintenu. Après 48 heures de culture, le MC a été récupéré et les VE sécrétées ont été isolées par ultracentrifugation pendant 16 heures. Leur caractérisation par NanoSight a montré que les VE sécrétées sont majoritairement de la taille des exosomes et des MP plutôt que des grosses particules telles que des corps apoptotiques. La présence d'exosomes dans les préparations de VE a été confirmée par test ELISA dirigé contre le CD9 (bien qu'aujourd'hui ce marqueur ne soit plus considéré comme spécifique aux exosomes). L'intégrité des VE a été visualisée par cryo-MET où différentes particules de la taille des exosomes et des MP majoritairement ont été observées. L'ultracentrifugation est donc efficace pour isoler les VE totales à partir du MC de cellules.

La capacité thérapeutique des Pg-CSEh générés a ensuite été étudiée dans un modèle d'ICC créé chez la souris par ligature permanente de l'artère coronaire descendante antérieure gauche. Ces cellules ont déjà montré leur efficacité thérapeutique lorsqu'elles sont incorporées dans un patch de fibrine greffé sur le myocarde infarci de rats en ICC (Bellamy et al., 2015). La première étape a été de confirmer ces résultats dans un modèle de souris en ICC où les cellules n'étaient pas incluses dans un patch éplicardique mais injectées dans le myocarde en zone péri-infarcié, par voie transcutanée, sous contrôle échocardiographique. Cette technique s'est révélée

particulièrement efficace puisqu'elle est associée à une mortalité quasi-nulle des souris injectées et a permis de retrouver les VE marquées au DiD 26 heures après les injections. L'injection de 500 000 Pg-CSEh par cœur de souris a montré une amélioration de la fonction cardiaque par rapport aux souris contrôles par échocardiographie six semaines après traitement bien que cette amélioration soit de faible intensité.

La deuxième série avait pour objectif de comparer le potentiel thérapeutique des VE dérivées de Pg-CSEh avec les Pg-CSEh issus de la même culture dans le même modèle murin d'ICC que précédemment. Six semaines après le traitement, les VE et les Pg-CSEh améliorent significativement et avec la même intensité la fonction cardiaque des souris en ICC en diminuant les volumes ventriculaires. A notre connaissance, cette constatation est la première de la littérature à confirmer la non-infériorité des VE par rapport à leurs cellules mères dans un modèle de pathologie cardiaque ischémique. Pour aller plus loin dans l'analyse de l'effet thérapeutique, des analyses histologiques et immuno-histochimiques ont été réalisées. Cependant, la plupart des résultats ne sont pas significativement différents entre les groupes à l'exception d'une augmentation significative du nombre de capillaires par CM chez les souris traitées avec les VE par rapport aux autres groupes. Toutefois, les souris traitées avec les VE et les Pg-CSEh ont tendance à avoir des infarctus plus petits, une fibrose moins étendue et une diminution de la taille des CM. L'effet thérapeutique des Pg-CSEh fraîchement injectés après le tri magnétique est similaire à celui des Pg-CSEh injectés après les 48 heures de culture sur vitronectine, avec toutefois, une amélioration plus importante de la fonction cardiaque dans ce dernier groupe.

L'analyse du transcriptome des cœurs des souris a rapporté que 927 gènes sont surexprimés chez les souris traitées avec les VE et les Pg-CSEh par rapport aux souris contrôles. Ces gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans 669 voies de signalisation dont 49 sont retenues pour leur pertinence et leur implication dans la fonction ou la réparation cardiaque. Ces voies sont prédites pour générer à 78% des effets bénéfiques en promouvant la survie et la prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN et en prévenant la fibrose.

Dans une approche mécanistique, le contenu en miARN des VE a été caractérisé. Afin d'augmenter la viabilité des Pg-CSEh, ceux-ci ont été inclus dans un patch de fibrine, conditions utilisées lors des travaux précédents du laboratoire chez le rat et actuellement dans le cadre d'un essai clinique (Bellamy et al., 2015; Menasché et al., 2015). Parmi les 800 miARN étudiés au Nanostring, deux grandes familles de miARNs se sont révélées être fortement exprimées dans les VE : la famille du miR-302 à 61% et la famille du miR-17 à 10%.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A l'origine, la thérapie cellulaire avait pour principal objectif d'apporter de nouvelles cellules viables à l'organe défectueux dans le but que celles-ci s'intègrent et rétablissent le fonctionnement normal de cet organe. De nombreuses études ont démontré des effets bénéfiques à la suite de la greffe cellulaire bien que, de manière surprenante, la plupart de ces cellules ne persistaient pas dans l'organe hôte et mourraient prématurément (Bellamy et al., 2015; Gneocchi et al., 2008). Ces constatations ont mené à évoquer une hypothèse paracrine impliquant les facteurs sécrétés par les cellules thérapeutiques qui pourraient stimuler des voies de réparation endogènes (Gneocchi et al., 2008), incluant une augmentation du nombre de CM par différenciation de cellules souches endogènes ou prolifération de cardiomyocytes différenciés (Garbern and Lee, 2013; Hsieh et al., 2007). Bien que des bénéfices fonctionnels aient été observés avec l'utilisation de MC ou de facteurs isolés (Lai et al., 2010), de nombreux arguments suggèrent que l'effet paracrine est largement médié par le contenu biologique des VE. Ainsi, de nombreux travaux ont rapporté l'efficacité thérapeutique de VE dérivées de cellules dans des modèles de pathologie différente tels que l'IDM (Akyurekli et al., 2015), l'ischémie du membre inférieur (Leroyer et al., 2009), l'insuffisance rénale aigüe (Bruno et al., 2012; Zhou et al., 2013) ou encore l'accident vasculaire cérébral (Doepfner et al., 2015; Xin et al., 2017) et l'hépatectomie partielle (Herrera et al., 2010; Nojima et al., 2016). Toutefois, les mécanismes par lesquels les VE peuvent récapituler les effets de leurs cellules mères ne sont encore qu'incomplètement compris. Afin de contribuer à cette compréhension, une comparaison directe entre les Pg-CSEh et les VE libérées par ces mêmes cellules a été réalisée dans un modèle d'ICC induit par un IDM. Cette étude, étant la première à comparer directement des VE avec leurs cellules mères, a montré une amélioration fonctionnelle équivalente, qui tend à renforcer l'hypothèse selon laquelle les VE sont des médiateurs-clés de l'effet paracrine des cellules greffées.

Les VE, incluant les exosomes et les MP, agiraient comme de véritables navettes dans la communication intercellulaire en transférant des biomolécules actives telles que du matériel génétique (ARNm, miARN) des protéines ou encore des lipides à leurs cellules cibles (Bobis-Wozowicz et al., 2015). L'utilisation thérapeutique des VE pourrait circonvenir les limites de l'utilisation du MC, comme la présence de larges molécules probablement incapables de

traverser les membranes, ou de facteurs isolés ayant un effet biologique restreint à une seule voie de signalisation. Les cellules possèderaient une machinerie d'emballage des biomolécules actives présentes dans les VE (Ogawa et al., 2013; Villarroja-Beltri et al., 2013). Les VE seraient ainsi une réplique de leurs cellules d'origine. En effet, les études de caractérisation ont montré que le contenu moléculaire et les marqueurs de surface des VE dépendent de la nature de la cellule mère, ce qui impacte directement le potentiel thérapeutique des VE. Par exemple, de nombreuses études utilisent les VE dérivées de fibroblastes comme contrôle vésiculaire négatif dans des modèles de pathologies cardiaques ischémiques, car ces VE n'ont aucun effet bénéfique sur la fonction cardiaque (Barile et al., 2014). Dans le domaine de la réparation cardiaque, de nombreux arguments plaident en faveur de l'utilisation de cellules engagées vers un phénotype cardiaque (Citro et al., 2014; Ebelt et al., 2007; Li et al., 2012; Matsuura et al., 2009; Oskouei et al., 2012; Rossini et al., 2011; Tokunaga et al., 2010; Zheng et al., 2013). C'est pourquoi, les Pg-CSEh ont été choisis comme source de VE dans cette étude, cellules choisies dans l'étude précédente du laboratoire et actuellement en essai clinique (Bellamy et al., 2015; Menasché et al., 2015).

Les Pg-CSEh ont été cultivés sur vitronectine, une matrice acellulaire permettant d'éviter la culture sur fibroblastes nourriciers dont les VE auraient été confondues avec celles issues des Pg-CSEh. De plus, cette matrice a été choisie pour sa compatibilité avec une utilisation en clinique. Bien qu'elle maintienne le phénotype des Pg-CSEh cultivés pendant 48 heures, elle n'est pas adaptée pour ce type cellulaire puisqu'elle ne permet pas de conserver la viabilité cellulaire. Toutefois, cette constatation n'est pas éliminatoire dans le sens où il a été démontré que les cellules stressées libèrent plus de VE. Tel est par exemple le cas des cellules stressées par hypoxie (Ratajczak et al., 2006). Imposer un stress aux cellules permettrait ainsi, pour un même temps de culture donné, de libérer davantage de VE et d'augmenter leur effet thérapeutique. Dans notre étude, les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine améliorent davantage la fonction cardiaque des souris que leurs homologues fraîchement injectés après le tri magnétique. Il a été démontré que des cellules stressées modifient leur contenu moléculaire et synthétisent des molécules bioactives en réponse au stress (de Jong et al., 2012). Dans notre étude, il est toutefois difficile de savoir si les Pg-CSEh ont été stressés en raison de leur culture sur vitronectine ou de l'absence de facteurs libérés par les fibroblastes nourriciers.

Le principal résultat de cette étude est que les bénéfices fonctionnels des Pg-CSEh injectés peuvent être récapitulés uniquement par l'injection des VE qui en sont dérivées dans un modèle d'ICC chez la souris. Dans de nombreuses études, les cellules thérapeutiques ou VE sont injectées directement après la ligature coronaire, c'est-à-dire au stade aigu de la pathologie. Dans cette étude, les cellules et VE ont été injectées trois semaines après l'induction de l'IDM, soit à un stade chronique de l'IC ce qui est plus proche de la réalité clinique. Cela a été possible grâce à l'acquisition de la technique d'injections intra-myocardiques transcutanées guidées par échographie qui est associée à une mortalité quasi-nulle. Les volumes ventriculaires sont diminués à la fois et de manière similaire chez les souris traitées par les Pg-CSEh et les VE. Les analyses histologiques et immuno-histochimiques n'ont cependant pas identifié de mécanismes par lesquels les VE pourraient agir puisque les différences intergroupes ne sont pas significatives, à l'exception d'une augmentation du nombre de capillaires chez les souris traitées avec les VE. Bien que cette observation puisse expliquer les bénéfices fonctionnels observés chez les souris traitées avec les VE, il est néanmoins peu probable que l'augmentation de l'angiogenèse soit le principal mécanisme de l'amélioration de la fonction cardiaque puisque les souris traitées avec les Pg-CSEh et les VE améliorent leur fonction cardiaque de façon identique. En revanche, l'analyse du transcriptome des cœurs des souris montre de réelles différences entre les souris traitées avec les Pg-CSEh et leurs VE comparées aux souris contrôles. Les 927 gènes différentiellement exprimés chez les souris traitées avec les VE par rapport aux souris contrôles prédisent l'implication de voies de réparation endogènes agissant sur l'augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN et la diminution de la fibrose. Bien que le lien moléculaire entre les Pg-CSEh et les VE et ces 927 gènes n'ait pas été établi, l'analyse du contenu en miARN des VE ouvre quelques pistes mécanistiques en montrant la forte expression de deux familles de miARN (miARN-302 et miARN-17), qui seraient impliquées dans la prolifération cellulaire, et notamment celle des CM, et dans leur maturation (Eulalio et al., 2012; Hayashita et al., 2005). Toutefois, les effets thérapeutiques des VE ne se limitent sans doute pas à un seul facteur ou à une seule famille de composés mais impliquent plus vraisemblablement un ensemble de biomolécules telles que des miARN, des ARNm, des protéines ou même des lipides (Bobis-Wozowicz et al., 2015; Gangoda et al., 2015; Ibrahim et al., 2014; Seeger et al., 2013) agissant de façon synergique. De plus, l'intérêt des VE ne réside pas seulement dans la nature de ce contenu mais aussi dans

leur capacité de le transférer en totalité dans les cellules cibles plus efficacement que ne pourrait le faire l'administration de composés individuels (Deregibus et al., 2007; Sun et al., 2010).

Bien que cette première étude soit considérée comme prometteuse pour le traitement de l'IC, elle a plusieurs limites.

1- Les VE totales sécrétées par les Pg-CSEh ont été caractérisées et injectées chez la souris en IC. L'analyse par NanoSight indique que les VE totales comprennent à la fois des exosomes et des MP mais les corps apoptotiques allant jusqu'à 5 000 nm ne peuvent être quantifiés correctement. L'analyse par cryo-MET a montré de très grosses particules susceptibles d'être des corps apoptotiques bien qu'ils n'aient pas été caractérisés et confirmés. Sur la base de l'hypothèse que les cellules agiraient via un mécanisme paracrine, il a été choisi d'injecter l'ensemble des sous-populations de VE ce qui se rapproche le plus du sécrétome des cellules transplantées. Le bénéfice thérapeutique n'a donc pas pu être associé à un seul type vésiculaire en particulier ou à une combinaison des différents types et il serait intéressant d'explorer l'implication de chaque sous-population de VE dans les effets bénéfiques observés. Cependant, l'étude des VE étant un axe de recherche plutôt récent, les outils permettant de les isoler et de les caractériser spécifiquement sont assez limités et se révèlent parfois peu efficaces. A ce jour, le défi le plus important est d'isoler les sous-types vésiculaires afin de déterminer le réel potentiel thérapeutique de chaque sous fraction. La méthode de référence pour l'isolation des VE est l'ultracentrifugation. La séparation des différentes sous-populations se fait alors grâce à des ultracentrifugations répétées en augmentant la vitesse de rotation graduellement. Le critère de séparation repose donc sur la taille et le poids des VE qui sont entraînées par la force de gravité, avec les corps apoptotiques d'abord récupérés à faible vitesse de rotation, puis les MP à vitesse moyenne et enfin les exosomes à haute vitesse. La taille des différents types vésiculaires se chevauchant, cette technique ne permet pas d'obtenir des sous-fractions de VE pures mais permet de les séparer grossièrement. De plus, l'ultracentrifugation à 100 000 g pour collecter les exosomes entraîne aussi certaines protéines du MC, provenant du milieu en lui-même ou des cellules, ce qui peut rendre les fractions de VE « contaminées » par ces protéines. Afin de les éliminer, des étapes de purification peuvent être ajoutées à la suite d'une ultracentrifugation ou l'ultracentrifugation peut être complètement remplacée. Parmi ces techniques, on retrouve la séparation par gradient de sucrose ou d'iodixanole, par immunoprécipitation en utilisant des billes couplées à des tétraspanines ou par chromatographie

d'exclusion de taille (Böing et al., 2014; Durcin et al., 2017; Kowal et al., 2016; Théry et al., 2006). Ces techniques peuvent aussi enrichir un sous-type de VE par rapport aux autres. Il semblerait que la technique par chromatographie soit plus efficace que la technique par ultracentrifugation et permette d'obtenir une pureté et un rendement des VE isolées meilleurs, sans affecter le contenu vésiculaire (Nordin et al., 2015). Elle pourrait être utilisée afin d'isoler les VE à large échelle ce qui aurait une réelle pertinence pour une utilisation clinique. Une autre étude a comparé différentes techniques d'isolation telles que l'ultracentrifugation, la séparation par gradient d'iodixanole ou grâce à des kits commerciaux comme ExoQuick™ et Total Exosome Isolation™ (Deun et al., 2014). Il semblerait que la séparation par gradient d'iodixanole donne les meilleurs résultats en termes de pureté et d'enrichissement des VE collectées mais que ces dernières auraient un contenu pauvre en protéines et ARN. De plus, ces VE auraient une signature ARN très différente de celles isolées avec les trois autres techniques. La technique d'isolation des VE pourrait donc jouer un rôle important dans leur efficacité puisqu'elle peut impacter leur contenu moléculaire.

2- Les Pg-CSEh ont été cultivés pendant 48 heures sur vitronectine afin d'éviter la culture sur fibroblastes nourriciers dont les VE auraient contaminé les VE dérivées des Pg-CSEh. Cette méthode de culture imposant un stress aux cellules n'est pas considérée comme néfaste puisque des cellules stressées libéreraient plus de VE (Ratajczak et al., 2006). Une autre source de contamination dans l'isolation des VE aurait pu être le milieu en lui-même. En effet, le sérum de veau fœtal (SVF), généralement ajouté aux milieux de culture, est très riche en VE susceptibles d'avoir un effet bénéfique biaisant celui des VE issues de Pg-CSEh. C'est pourquoi le SVF a été remplacé par le supplément B27 car il est compatible avec une utilisation clinique et l'analyse par NanoSight a montré une très faible quantité de particules, considérée comme négligeable. Il est possible que ce changement de conditions de culture puisse affecter l'effet thérapeutique des Pg-CSEh. Cependant, il a été montré que l'efficacité thérapeutique des Pg-CSEh cultivés pendant 48 heures sur vitronectine est similaire à celle des Pg-CSEh injectés directement en sortie de tri magnétique. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les Pg-CSEh fraîchement triés subissent aussi un stress dû à l'injection, l'inflammation ou encore le rejet, ce qui les rend comparables à ceux cultivés sur vitronectine. Les Pg-CSEh, stressés *in vitro* ou *in vivo*, auraient en commun d'entrer en apoptose et de sécréter des VE issues de cet état apoptotique. Il semble toutefois que les Pg-CSEh cultivés sur vitronectine soient plus efficaces,

peut-être en raison d'une plus longue durée de stress infligé aux cellules. Cette hypothèse est supportée par l'observation que l'injection du MC dérivé de cellules mononucléées du sang périphérique irradiées en apoptose diminue le remodelage cardiaque dans des modèles d'IC chez le rat et le cochon (Lichtenauer et al., 2011).

3- Les valeurs fonctionnelles cardiaques pré-injections n'étaient pas comparables entre les groupes du fait d'une répartition aléatoire des souris. Cependant, l'évaluation des différents traitements a pu être réalisée grâce à une comparaison intra-groupe analysant l'évolution des paramètres cardiaques dans le temps. Pour l'analyse des données histologiques, un sous-groupe de cinq souris a été sélectionné où les valeurs fonctionnelles de base étaient similaires entre les groupes, permettant ainsi de les comparer entre eux. Les résultats fonctionnels retrouvés sont similaires avec une amélioration équivalente des paramètres cardiaques chez les souris traitées avec les Pg-CSEh et les VE et une supériorité de ces deux groupes par rapport aux souris contrôles. Toutefois, la plupart des analyses histologiques et immuno-histochimiques ne sont pas significativement différentes, ce qui pourrait être dû au nombre insuffisant d'animaux par groupe. Les résultats précédents du laboratoire ont démontré que les Pg-CSEh incorporés dans un patch de fibrine greffé sur le myocarde péri-infarci de rat en ICC augmentent le nombre de capillaires et diminuent la fibrose (Bellamy et al., 2015). Dans notre étude, le nombre de capillaires est augmenté significativement chez les souris traitées avec les VE et la fibrose a tendance à diminuer chez les souris traitées avec les Pg-CSEh et les VE ce qui est cohérent avec les résultats observés précédemment.

4- Les VE caractérisées *in vitro* ont été préalablement congelées alors que les VE fraîchement préparées ont été directement injectées chez la souris. Cette différence, entre VE congelées et non congelées, peut avoir des répercussions sur leur efficacité puisque les processus de congélation et de décongélation peuvent entraîner une fusion ou une fission des VE. Cependant, l'analyse au qNano a montré que seulement 3% des VE sont fusionnées ce qui est considéré comme négligeable et ne devrait pas impacter l'efficacité des VE. De plus, les profils de taille et de distribution des VE analysées au NanoSight et au qNano sont similaires alors que les VE analysées au qNano ont subi un cycle supplémentaire de congélation-décongélation. Les cycles de congélation-décongélation ne sembleraient pas impacter leur forme, mais leur efficacité peut être affectée. Des analyses de stabilité des VE seront néanmoins indispensables pour valider la

fonctionnalité des VE avant un passage à la clinique qui nécessitera de les conserver congelées avant usage.

5- La fonction cardiaque des souris contrôles est améliorée ce qui est clairement une limite du modèle dans la mesure où la souris a un potentiel inné important de compensation et/ou de réparation cardiaque endogène. Les données de la littérature montrent que les souris néonatales ont une capacité régénérative spontanée lorsque qu'on sectionne une partie du cœur, bien que cette faculté soit perdue après 7 jours (Haubner et al., 2012; Porrello et al., 2011). Toutefois, la souris développe très rapidement des collatérales après une occlusion coronaire, y compris dans les lignées immuno-déficientes (Zhang and Faber, 2015). De plus, le cœur de la souris adulte contient environ deux fois plus de CM que celui du rat (Banerjee et al., 2007) et de l'homme (Jugdutt, 2003), ce qui peut naturellement contribuer davantage à la récupération fonctionnelle après une agression ischémique. Cette compensation peut conduire à des chiffres relativement élevés de FE alors même que les volumes restent pathologiques mais varient dans la même direction ; c'est pourquoi, les valeurs du VTS et du VTD sont des paramètres plus pertinents que la FE pour l'analyse de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque des souris. L'évaluation de l'effet des VE sur le pool de CM fera l'objet d'une prochaine étude utilisant un modèle de souris transgéniques MerCreMer-Zeg (Hsieh et al., 2007) qui permettra notamment de savoir si les VE induisent une maturation des cellules souches cardiaques endogènes ou une prolifération des CM déjà existants.

6- L'analyse des miARN des VE issues de Pg-CSEh inclus dans un patch de fibrine représente les conditions de culture des Pg-CSEh utilisées dans l'étude précédente du laboratoire chez le rat et dans l'essai clinique actuellement en cours. Cependant, les Pg-CSEh stressés par culture sur vitronectine pourraient sécréter des VE ayant un contenu différent de celui de VE issues de Pg-CSEh inclus dans un patch de fibrine dont la viabilité est maintenue. L'analyse des miARN contenus dans les VE dérivées de Pg-CSEh cultivés pendant 48 heures sur vitronectine serait donc plus comparable au contenu des VE injectées aux souris en IC. La technologie choisie a permis d'analyser 800 miARN connus ce qui représente une première phase exploratrice. Une analyse de criblage à haut débit sera nécessaire pour mieux caractériser le contenu en miARN des VE.

7- Enfin, bien que les VE aient été retrouvées 26 heures après injections intra-myocardiques (démontrant ainsi l'efficacité de la technique d'injections guidées par échographie), une étude de biodistribution des VE dans le temps est également nécessaire pour analyser l'éventuelle migration extracardiaque des VE injectées.

Bien que la thérapie basée sur les VE dérivées de Pg-CSEh soit prometteuse dans le traitement de l'IC, la culture et l'obtention des Pg-CSEh restent des procédures techniquement complexes avec un rendement qui n'est pas nécessairement suffisant pour disposer du nombre sans doute élevé de VE à but thérapeutique. Pour ces raisons, mais aussi dans un but explorateur, le type cellulaire pour la production des VE a été modifié pour identifier celui qui donnera les VE les plus efficaces pour le traitement de l'ICC. Ces investigations font l'objet de la deuxième partie de ma thèse où les effets de VE dérivées de CM-iPS et de CSM ont été étudiés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA PREMIERE PARTIE

- Akyurekli, C., Le, Y., Richardson, R.B., Fergusson, D., Tay, J., and Allan, D.S. (2015). A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev.* *11*, 150–160.
- Alonso-Betanzos, A., Bolón-Canedo, V., Heyndrickx, G.R., and Kerkhof, P.L. (2015). Exploring Guidelines for Classification of Major Heart Failure Subtypes by Using Machine Learning. *Clin. Med. Insights Cardiol.* *9*, 57–71.
- Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K., and Baudino, T.A. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *293*, H1883-1891.
- Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *103*, 530–541.
- Bellamy, V., Vanneaux, V., Bel, A., Nemetalla, H., Emmanuelle Boitard, S., Farouz, Y., Joanne, P., Perier, M.-C., Robidel, E., Mandet, C., et al. (2015). Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *34*, 1198–1207.
- Bobis-Wozowicz, S., Kmiotek, K., Sekula, M., Kedracka-Krok, S., Kamycka, E., Adamiak, M., Jankowska, U., Madetko-Talowska, A., Sarna, M., Bik-Multanowski, M., et al. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 2748–2761.
- Böing, A.N., Pol, E. van der, Grootemaat, A.E., Coumans, F.A.W., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J. Extracell. Vesicles* *3*.
- Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Biancone, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PloS One* *7*, e33115.
- Citro, L., Naidu, S., Hassan, F., Kuppusamy, M.L., Kuppusamy, P., Angelos, M.G., and Khan, M. (2014). Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PloS One* *9*, e116281.
- Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., and Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* *110*, 2440–2448.

Deun, J.V., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., Wever, O.D., and Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J. Extracell. Vesicles* 3.

Doepfner, T.R., Herz, J., Görgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A.-K., Radtke, S., de Miroschedji, K., Horn, P.A., Giebel, B., and Hermann, D.M. (2015). Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1131–1143.

Durcin, M., Fleury, A., Taillebois, E., Hilairret, G., Krupova, Z., Henry, C., Truchet, S., Trötz Müller, M., Köfeler, H., Mabileau, G., et al. (2017). Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 6, 1305677.

Ebelt, H., Jungblut, M., Zhang, Y., Kubin, T., Kostin, S., Technau, A., Oustanina, S., Niebrügge, S., Lehmann, J., Werdan, K., et al. (2007). Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 236–244.

Eulalio, A., Mano, M., Dal Ferro, M., Zentilin, L., Sinagra, G., Zacchigna, S., and Giacca, M. (2012). Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492, 376–381.

Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., and Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics* 15, 260–271.

Garbern, J.C., and Lee, R.T. (2013). Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 12, 689–698.

Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., and Dzau, V.J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res.* 103, 1204–1219.

Grange, C., Tapparo, M., Bruno, S., Chatterjee, D., Quesenberry, P.J., Tetta, C., and Camussi, G. (2014). Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int. J. Mol. Med.* 33, 1055–1063.

Haubner, B.J., Adamowicz-Brice, M., Khadayate, S., Tiefenthaler, V., Metzler, B., Aitman, T., and Penninger, J.M. (2012). Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging* 4, 966–977.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628–9632.

Herrera, M.B., Fonsato, V., Gatti, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantarella, D., Calogero, R., Bussolati, B., Tetta, C., and Camussi, G. (2010). Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1605–1618.

Hsieh, P.C.H., Segers, V.F.M., Davis, M.E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkenkin, J.D., Robbins, J., and Lee, R.T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat. Med.* *13*, 970–974.

Ibrahim, A.G.-E., Cheng, K., and Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* *2*, 606–619.

Inoue, Y., Izawa, K., Kiryu, S., Tojo, A., and Ohtomo, K. (2008). Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice. *Mol. Imaging* *7*, 21–27.

de Jong, O.G., Verhaar, M.C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R.M., Gucek, M., and van Balkom, B.W.M. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles* *1*.

Jugdutt, B.I. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* *108*, 1395–1403.

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E968-977.

Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* *4*, 214–222.

Leroyer, A.S., Ebrahimian, T.G., Cochain, C., Récalde, A., Blanc-Brude, O., Mees, B., Vilar, J., Tedgui, A., Levy, B.I., Chimini, G., et al. (2009). Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* *119*, 2808–2817.

Li, T.-S., Cheng, K., Malliaras, K., Smith, R.R., Zhang, Y., Sun, B., Matsushita, N., Blusztajn, A., Terrovitis, J., Kusuoka, H., et al. (2012). Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* *59*, 942–953.

Lichtenauer, M., Mildner, M., Baumgartner, A., Hasun, M., Werba, G., Beer, L., Altmann, P., Roth, G., Gyöngyösi, M., Podesser, B.K., et al. (2011). Intravenous and intramyocardial injection of apoptotic white blood cell suspensions prevents ventricular remodeling by increasing elastin expression in cardiac scar tissue after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* *106*, 645–655.

Matsuura, K., Honda, A., Nagai, T., Fukushima, N., Iwanaga, K., Tokunaga, M., Shimizu, T., Okano, T., Kasanuki, H., Hagiwara, N., et al. (2009). Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 2204–2217.

Menasché, P., Vanneau, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived

cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* 36, 2011–2017.

Mohtasebi, M.S., Nasri, F., and Kamali Sarvestani, E. (2014). Effect of DiD Carbocyanine Dye Labeling on Immunoregulatory Function and Differentiation of Mice Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2014, e457614.

Nojima, H., Freeman, C.M., Schuster, R.M., Japtok, L., Kleuser, B., Edwards, M.J., Gulbins, E., and Lentsch, A.B. (2016). Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J. Hepatol.* 64, 60–68.

Nordin, J.Z., Lee, Y., Vader, P., Mäger, I., Johansson, H.J., Heusermann, W., Wiklander, O.P.B., Hällbrink, M., Seow, Y., Bultema, J.J., et al. (2015). Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 879–883.

Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M., and Yanoshita, R. (2013). Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 66–75.

Oskouei, B.N., Lamirault, G., Joseph, C., Treuer, A.V., Landa, S., Da Silva, J., Hatzistergos, K., Dauer, M., Balkan, W., McNiece, I., et al. (2012). Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 116–124.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078–1080.

Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487–1495.

Rossini, A., Frati, C., Lagrasta, C., Graiani, G., Scopece, A., Cavalli, S., Musso, E., Baccarin, M., Di Segni, M., Fagnoni, F., et al. (2011). Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin. *Cardiovasc. Res.* 89, 650–660.

Seeger, F.H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2013). MicroRNAs in stem cell function and regenerative therapy of the heart. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1739–1746.

Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Barnes, S., Grizzle, W., Miller, D., and Zhang, H.-G. (2010). A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1606–1614.

Texier, I., Goutayer, M., Da Silva, A., Guyon, L., Djaker, N., Josserand, V., Neumann, E., Bibette, J., and Vinet, F. (2009). Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* 14, 054005.

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol. Chapter 3*, Unit 3.22.

Tokunaga, M., Liu, M.-L., Nagai, T., Iwanaga, K., Matsuura, K., Takahashi, T., Kanda, M., Kondo, N., Wang, P., Naito, A.T., et al. (2010). Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 972–983.

Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* *4*.

Xin, H., Wang, F., Li, Y., Lu, Q.-E., Cheung, W.L., Zhang, Y., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2017). Secondary Release of Exosomes From Astrocytes Contributes to the Increase in Neural Plasticity and Improvement of Functional Recovery After Stroke in Rats Treated With Exosomes Harvested From MicroRNA 133b-Overexpressing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Transplant.* *26*, 243–257.

Zhang, H., and Faber, J.E. (2015). De-novo collateral formation following acute myocardial infarction: Dependence on CCR2⁺ bone marrow cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *87*, 4–16.

Zheng, S.-X., Weng, Y.-L., Zhou, C.-Q., Wen, Z.-Z., Huang, H., Wu, W., Wang, J.-F., and Wang, T. (2013). Comparison of cardiac stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on the cardiac electrophysiology in rats with myocardial infarction. *Stem Cell Rev.* *9*, 339–349.

Zhou, Y., Xu, H., Xu, W., Wang, B., Wu, H., Tao, Y., Zhang, B., Wang, M., Mao, F., Yan, Y., et al. (2013). Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* *4*, 34.

TROISIÈME PARTIE : COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE DE VÉSICULES EXTRACELLULAIRES DÉRIVÉES DE DEUX TYPES CELLULAIRES DIFFÉRENTS, CARDIOMYOCYTES ET CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES D'ORIGINE HUMAINE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

La première partie de mon projet de thèse a montré que les VE dérivées de Pg-CSEh peuvent récapituler les effets thérapeutiques de leurs cellules d'origine dans un modèle murin d'ICC. Il a été démontré que le type de cellule utilisé en thérapie cellulaire est important et que des cellules déjà engagées dans la voie cardiaque semblent donner de meilleurs résultats fonctionnels par rapport aux cellules non cardiaques (CSM, myoblastes). Le choix du type cellulaire est donc primordial pour produire des VE efficaces dans le traitement de l'ICC. Dans cette nouvelle étude, des VE issues de CM dérivés d'iPS (CM-iPS) et de CSM ont été testées afin de choisir la source cellulaire produisant les VE les plus efficaces pour le traitement de l'ICC. Ces deux types cellulaires ont déjà démontré leur potentiel thérapeutique dans de nombreux modèles de pathologies ischémiques (Citro et al., 2014; Karantalis and Hare, 2015; van Laake et al., 2007). Cette étude comporte deux objectifs :

- renseigner sur le stade de maturation idéal de cellules déjà engagées dans la voie cardiaque (Pg de la première étude par rapport à des CM battants)
- observer si la supériorité des effets thérapeutiques de cellules cardiaques (CM-iPS) par rapport aux cellules non cardiaques (CSM) est aussi retrouvée lorsque nous injectons les VE sécrétées par ces deux types cellulaires.

Dans cette étude, les VE ont d'abord été caractérisées *in vitro* par NTA puis ont été évaluées dans le même modèle animal d'ICC. L'efficacité thérapeutique de CM-iPS a aussi été évaluée afin de comparer directement leurs effets avec les VE qui en sont dérivées.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Culture et caractérisation des cellules

a) *Culture des CM-iPS*

Les CM-iPS proviennent de l'entreprise Cellular Dynamics International (iCell Cardiomyocytes, CMC : 100-010-005, CDI, Madison, WI, USA). Les cellules sont décongelées selon les recommandations du fournisseur etensemencées à une densité de 53 000 cellules/cm² sur des flasques préalablement coatées à la gélatine 0.1% (G1890, Sigma Aldrich). Elles sont cultivées pendant 48 heures à 37°C et 7% CO₂ dans le milieu iCell Cardiomyocytes Plating (CMM-100-110-001, CDI). A partir du deuxième jour de culture, le milieu est remplacé par le milieu de maintenance iCell Cardiomyocyte Maintenance (CMC-100-120-005, CDI) jusqu'au septième jour de culture, en changeant le milieu tous les jours. A la fin de la culture, les cellules deviennent battantes. Le MC est récupéré au septième jour de culture pour collecter les VE totales sécrétées sur les 24 dernières heures. Au total, quatre cultures indépendantes ont été réalisées. Pour chaque culture, les CM-iPS et leurs VE ont été caractérisés *in vitro* et leur efficacité thérapeutique évaluée *in vivo*.

b) *Culture des CSM*

Des CSM issues de cordons ombilicaux, obtenus à l'Hôpital Saint-Louis après consentement des parturientes, sont cultivées sur des flasques coatées à la gélatine à 0.1% à une densité de 10 000 cellules/cm² dans du milieu de culture α MEM (Macopharma) supplémenté de 10% de SVF (S1810, Biowest, Nuaille, France) et 1% de pénicilline/streptomycine/amphotérycine (PSA, A5955, Sigma Aldrich). Pour limiter les biais dans la collection des VE, le SVF, qui est très riche en VE, est remplacé par de l'albumine de sérum bovin (BSA, *Bovine Serum Albumin*) à 0.5% au troisième jour de culture et les CSM sont cultivées pendant encore 24 heures. Le MC est ensuite récupéré pour en collecter les VE totales. Quatre cultures ont été réalisées et les CSM et leurs VE ont été caractérisés *in vitro* et évalués *in vivo*.

c) *Caractérisation des cellules*

Après avoir collecté le MC, les cellules sont trypsinées, récupérées et comptées. Concernant les CSM, leur viabilité est évaluée par comptage au bleu Trypan puis elles sont cytopspinées pour caractérisation par immuno-histochimie. Les CM-iPS, resuspendus en PBS 1X, sont directement injectés chez les souris en ICC à une concentration de 1,4 millions de cellules par souris. A la fin des injections, les cellules sont de nouveau comptées et leur viabilité est évaluée par bleu Trypan. Les CM-iPS restants sont cytopspinés à 2 000 rpm pendant 5 minutes à une concentration de 5 000 cellules par lame pour leur caractérisation par immuno-histochimie. Les CM-iPS et CSM cytopspinés sont fixés au PFA à 4% et caractérisés pour les marqueurs de CM matures tels que MYH7 (dilution 1/10, MAB1552, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne), ACTN2 (dilution 1/500, A7811, Sigma Aldrich) et TNNI3 (dilution 1/200, ab52862, Abcam) pour les CM-iPS et par VIM (M0725, DakoCytomationGlostrup, Danemark) et THY1 (ou CD90, 554892, dilution 1/100, Becton Dickinson) pour les CSM. Les cellules restantes ont été congelées en culot sec pour caractérisation par qPCR.

2. Isolation et caractérisation des vésicules extracellulaires

Comme dans la première étude, les MC préalablement centrifugés à faible vitesse (1200 rpm pendant 6 minutes) pour enlever les débris cellulaires sont ultracentrifugés à 99 855 g (37 500 rpm, rotor 60Ti, Beckman Coulter) pendant 16 heures à 4°C, avec accélération et décélération au maximum, ce qui permet de collecter les VE totales libérées par les cellules (exosomes, MP et corps apoptotiques) (voir p.79). Le surnageant est enlevé et les VE sont reprises dans du PBS 1X filtré à 0.1 µm dans le même volume que celui de leurs cellules mères pour une meilleure comparaison cellules/VE. Les VE sont ensuite caractérisées par NanoSight à un niveau de caméra (*camera level*) à 8 et un seuil de détection (*threshold*) à 5 dans l'équipe de Clotilde Théry à l'Institut Curie. Pour chaque échantillon, deux dilutions sont analysées et les données sont moyennées. Pour chaque dilution, 5 vidéos de 30 secondes sont enregistrées.

3. Evaluation du potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires *in vivo*

L'effet thérapeutique des VE et cellules a été évalué selon le même schéma expérimental que celui de la première étude (IDM, échographies pré-greffes, administration des traitements par injections transcutanées guidées par échographie, échographies post-greffes, voir p.90). Toutefois, quelques paramètres diffèrent : 1) la répartition des souris dans les différents groupes de traitement s'est faite de manière contrôlée de façon à ce que les paramètres cardiaques soient homogènes entre les groupes rendant la comparaison intergroupe possible et 2) les échographies post-greffes sont réalisées 7 semaines après l'administration du traitement pour des raisons logistiques.

Dans cette étude, différents groupes de traitement sont formés :

- 1) PBS 1X filtré à 0.1 μm en tant que groupe contrôle,
- 2) CM-iPS pour comparer directement l'effet de ces cellules avec les VE qui en sont dérivées,
- 3) VE dérivées de CM-iPS afin d'observer si un stade de maturation plus avancé permet d'obtenir de meilleurs résultats fonctionnels (par comparaison avec les VE dérivées de Pg dans la première étude),
- 4) VE de CSM afin de comparer l'efficacité des VE issues d'un type cellulaire non cardiaque,
- 5) Autre groupe contrôle de souris ayant subi un IDM et quatre pénétrations de l'aiguille sans injection (*sham*).

Les souris dont la FE est inférieure à 50% reçoivent les traitements via 4 injections transcutanées directement en zone péri-infarctée, dont le volume total varie entre 40 et 60 μL par souris selon les groupes. Dans le groupe 2, les souris reçoivent 1.4 millions de CM-iPS et celles traitées avec les VE de CM-iPS (groupe 3) et de CSM (groupe 4) reçoivent les VE sécrétées par 1.4 millions de cellules récupérées en fin de culture. Sept semaines post-traitement, l'efficacité des différents traitements est évaluée par échocardiographie par le même cardiologue (Hany Nemetalla) en aveugle des groupes de traitement. Le cœur des souris est récupéré et la moitié des cœurs est congelée en azote liquide pour des analyses histologiques et

l'autre moitié en cryotube pour des analyses transcriptomiques. Les cœurs ont été répartis dans les deux groupes d'analyse de manière à ce que les paramètres cardiaques pré-greffes soient homogènes entre les groupes de traitement.

4. Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée en aveugle du groupe de traitement par Marie-Cécile Perier. Pour comparer l'évolution de la fonction et des volumes cardiaques avant et après traitement, des tests paramétriques de Student appariés sont utilisés ainsi que des tests d'analyse de variance (ANOVA), avec ajustement de Tukey pour les comparaisons multiples 2 à 2. Pour toutes les analyses, le seuil de significativité des tests bilatéraux est fixé à 5%. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne +/- erreur type (SEM). Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1. Caractérisation des cellules

A la fin de chaque culture, la viabilité des cellules est évaluée par comptage au bleu Trypan. La viabilité des CSM est en moyenne de 96% et celle des CM-iPS de 71% (Tableau 7). Cette différence s'explique par le fait que les CSM ont été comptées directement après avoir été trypsinées alors que les CM-iPS ont été comptées à la fin des injections, soit quelques heures plus tard. Bien que la viabilité des CM-iPS soit diminuée, les cellules injectées chez les souris ont conservé une viabilité correcte malgré le stress qui leur est infligé lors de leur passage à travers l'aiguille et le fait qu'elles soient restées dans du PBS à température ambiante pendant quelques heures dans la seringue d'injection. Les CM-iPS étant des cellules de grande taille, il a fallu les homogénéiser dans la seringue entre chaque souris. Un comptage avant et après injections a permis de s'assurer que nous injectons bien 1.4 millions de cellules par souris.

Cellules	Préparation	Viabilité au bleu Trypan
CM-iPS	1	78%
	2	70%
	3	62%
	4	74%
CSM	1	99%
	2	91%
	3	94%
	4	98%

Tableau 7 : Viabilité des CM-iPS et des CSM en fin de culture.

Pour chaque culture, le phénotype des cellules a été confirmé par les marqueurs de CM matures MYH7, ACTN2 et TNNI3 pour les CM-iPS et par les marqueurs VIM et THY1 pour les CSM (Figure 37). Pour chaque marquage, plus de 90% des cellules étaient positives.

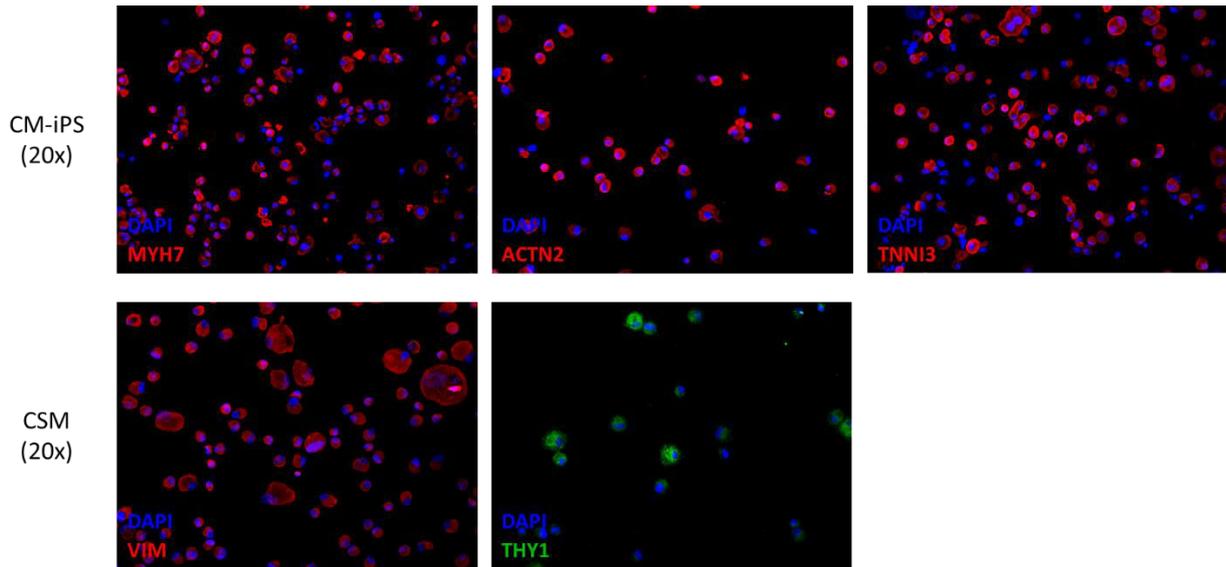


Figure 37 : Analyses du phénotype des CM-iPS et des CSM en fin de culture par immuno-histochimie.

2. Caractérisation des vésicules extracellulaires

Les VE dérivées de CM-iPS et de CSM ont été caractérisées par NTA. Les spectres de la distribution de taille des VE sont plutôt similaires entre les deux types cellulaires (Figure 38). Toutefois, les CM-iPS sécrètent plus de particules dont la taille est inférieure à 150 nm, en moyenne 63% (suggérant des exosomes), que les CSM, avec une moyenne de 24%. Les CSM libèrent donc davantage de particules supérieures à 150 nm (qui pourraient être des MP) avec une moyenne de 76%, contre 38% pour les CM-iPS (Tableau 8). Cette différence de sous-type vésiculaire en fonction du type cellulaire pourrait avoir des effets différents sur l'efficacité des VE puisque nous ne savons pas si les effets bénéfiques sont médiés par les exosomes, les MP, les corps apoptotiques, ou par leur combinaison. Les CM-iPS et les CSM libèrent en moyenne respectivement 3600 et 2700 particules en 24 heures.

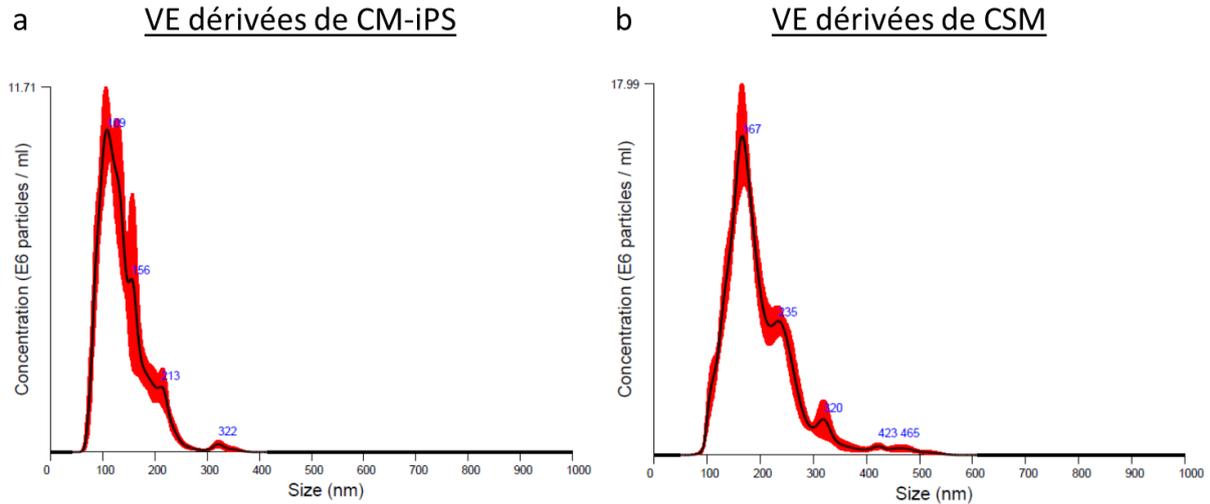


Figure 38 : Spectres de la distribution de taille des VE dérivées de CM-iPS (a) et de CSM (b).

Cellules	Préparation	Concentration totale (particules/ μ L)	Rendement (particules/cellule)	Taille des particules au pic de concentration (nm)	% particules 50-150 nm	% particules 151-500 nm	% particules 501-1000 nm
CM-iPS	1	1,10E+08	3152	107	61%	39%	0%
	2	9,81E+07	3468	126	59,5%	40,5%	0%
	3	8,47E+07	3389	104	67%	33%	0%
	4	1,08E+08	4447	114	65,5%	34,5%	0%
CSM	1	6,19E+07	2653	168	23%	77%	0%
	2	3,54E+07	1557	150	25%	74,5%	0,5%
	3	1,14E+08	4468	150	26,5%	72,5%	1%
	4	5,93E+07	2264	166	22%	77%	1%

Tableau 8 : Caractéristiques des VE issues de CM-iPS et de CSM pour chaque culture analysées au NanoSight.

3. Etude de l'effet thérapeutique des différents traitements *in vivo*

Dans cette série, 159 souris ont subi un IDM par ligature permanente de l'artère coronaire antérieure gauche. Sur les 106 souris échographiées, 89 d'entre elles ont été incluses dans l'étude et réparties dans les différents groupes de traitement de manière homogène pour une meilleure comparaison des paramètres cardiaques. Dix-neuf d'entre elles ont reçu les CM-iPS, 21 ont reçu les VE de CM-iPS, 13 ont reçu les VE de CSM, 19 ont reçu du PBS en tant que contrôle et 7 sont des souris témoins *sham*, les autres étant décédées entre les échographies et les injections. Après 7 semaines de traitement, 17 souris injectées au PBS, 18 traitées avec les CM-iPS, 20 avec les VE de CM-iPS, 11 avec les VE de CSM et 6 souris *sham* ont de nouveau été échographiées par le même échographiste afin de comparer l'évolution de la fonction cardiaque (Figure 39). En prenant en compte uniquement les souris incluses et ayant survécu

jusqu'à la fin de l'étude, aucune différence statistique n'a été observée entre les groupes avant l'administration du traitement ($p=0.52$, 0.61 et 0.77 avant traitement pour le VTS, le VTD et la FE respectivement).

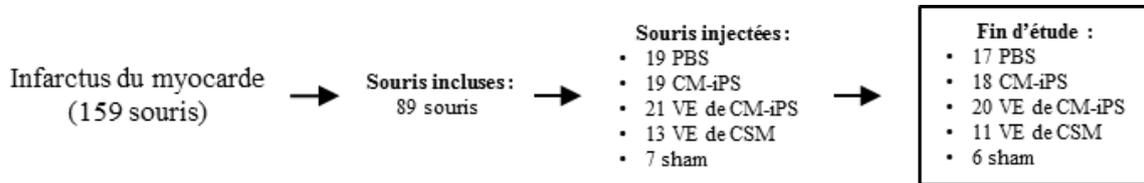


Figure 39 : Récapitulatif du nombre de souris à chaque étape de l'étude expérimentale in vivo.

Après sept semaines de traitement, aucune différence significative intergroupe n'a été retrouvée ce qui signifie que les iPS-CM, leurs VE et les VE de CSM n'ont pas eu d'effet sur la fonction cardiaque. Toutefois, les évolutions intragroupes montrent des différences significatives : les souris traitées avec les CM-iPS améliorent significativement leur fonction cardiaque avec une diminution du VTS de $1.70 \mu\text{L} \pm 0.65 \mu\text{L}$ (diminution de 4.2% en pourcentage de t_0) et du VTD de $1.26 \mu\text{L} \pm 0.57 \mu\text{L}$ (1.8%) et une augmentation de la FE de $1.55\% \pm 0.58\%$ (3.7%) (Figure 40a, b et c). De la même manière, la fonction cardiaque des souris traitées avec les VE de CM-iPS et les VE de CSM est significativement améliorée avec, respectivement, une diminution du VTS de $1.88 \mu\text{L} \pm 0.57 \mu\text{L}$ et de $1.49 \mu\text{L} \pm 0.51 \mu\text{L}$ et du VTD de $1.26 \mu\text{L} \pm 0.52 \mu\text{L}$ et de $0.54 \mu\text{L} \pm 0.59 \mu\text{L}$ (NS). Cependant, les volumes cardiaques sont également diminués chez les souris contrôles injectées au PBS avec une diminution du VTS de $2.11 \mu\text{L} \pm 0.45 \mu\text{L}$ et du VTD de $0.96 \mu\text{L} \pm 0.48 \mu\text{L}$ (NS) et la FE est significativement augmentée de $2.29 \mu\text{L} \pm 0.39 \mu\text{L}$. Ces améliorations fonctionnelles sont probablement dues à la récupération fonctionnelle naturelle de la souris immunodéficente atteinte d'ICC.

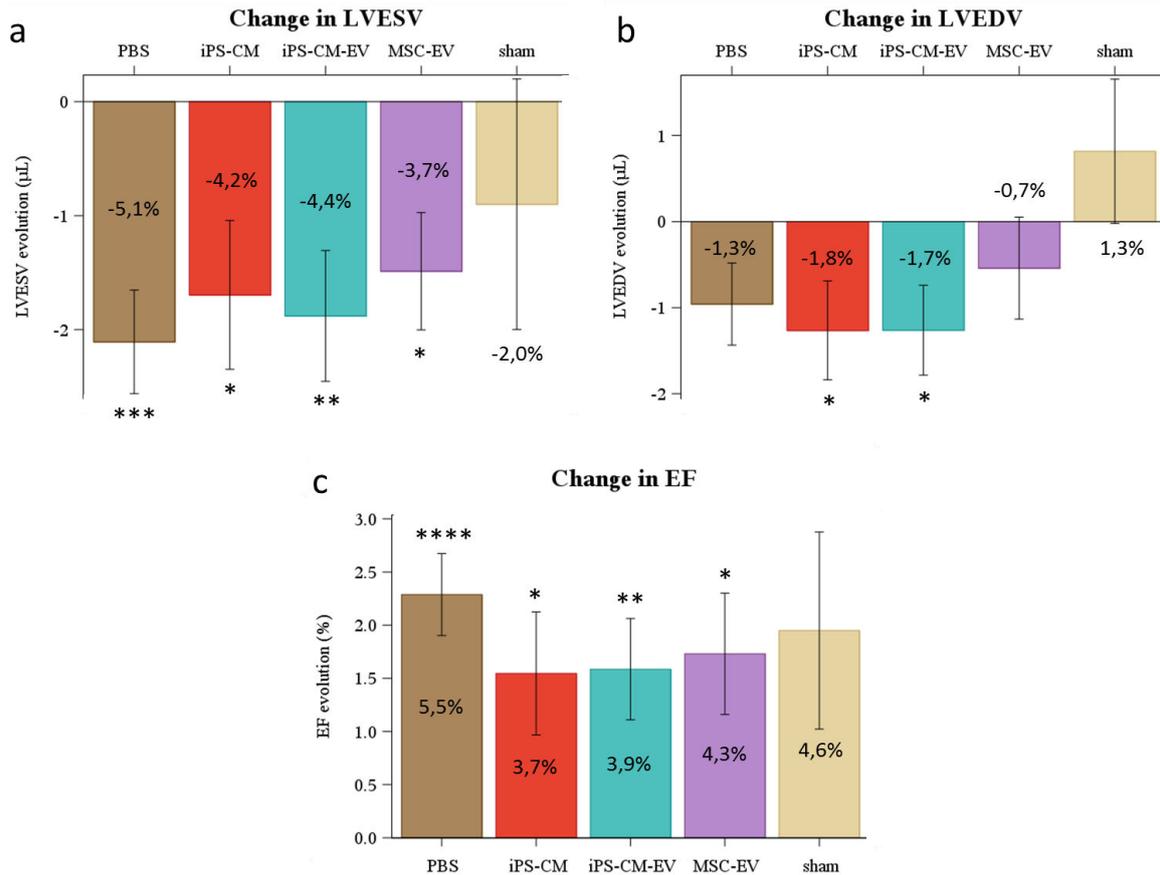


Figure 40 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les CM-iPS, les VE issues de CM-iPS et les VE issues de MSC par rapport aux souris contrôles et sham a) Evolution du VTS en microlitres. b) Evolution du VTD en microlitres. c) Evolution de la FE en pourcentage. Les étiquettes à l'intérieur des barres des graphiques représentent l'évolution en pourcentage de t_0 . * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Dans la mesure où les différents traitements n'avaient pas amélioré la fonction cardiaque des souris en ICC, les analyses histologiques et transcriptomiques n'ont pas été réalisées sur les cœurs de souris récupérés à la fin de l'étude.

4. Expériences complémentaires

Les résultats obtenus *in vivo* étant négatifs, des tests complémentaires ont été réalisés afin de comprendre ces données. D'abord, les milieux de culture vierges, c'est-à-dire, les milieux seuls, sans cellules, ont été ultracentrifugés à 99 855 g (37 500 rpm, rotor 60Ti, Beckman Coulter) pendant 16 heures à 4°C et les VE totales ont été reprises dans un minimum de volume de PBS 1X et analysées par NTA. Cette analyse a été faite afin de s'assurer que les VE sont bien issues des cellules thérapeutiques et non du milieu de culture. Le milieu de culture des CSM (α MEM

+ 0.5% BSA + 1% PSA) s'est avéré être très pauvre en VE. Le nombre de particules observées à l'écran était insuffisant pour être quantifié par NTA et les particules issues du milieu de culture ont donc été considérées comme négligeables dans l'analyse des VE provenant du MC. Dans ce milieu, le SVF contenant un nombre important de VE, avait été remplacé par la BSA afin d'éliminer ces VE. En revanche, le milieu de culture des CM-iPS (iCell Cardiomyocytes Maintenance) s'est révélé extrêmement riche en particules. Les VE issues du MC de CM-iPS et du milieu vierge ont été exprimées en nombre de particules/mL de milieu (conditionné ou vierge) (Tableau 9). La quantité moyenne de particules libérées par les CM-iPS est de 7.41×10^8 et est de 8.68×10^8 dans le milieu vierge. Le nombre de particules uniquement libérées par les CM-iPS n'étant pas possible à déterminer (soustraction menant à un chiffre négatif), ces données suggèrent toutefois que la grande majorité des VE proviennent du milieu de culture et que les CM-iPS sécrèteraient donc une très faible quantité de VE dans ces conditions de culture. Cette faible quantité pourrait s'expliquer par une faible activité sécrétoire intrinsèque liée au caractère mature des cellules, la formation d'agrégats de VE sous-estimant le nombre de VE quantifiées ou l'utilisation des particules (provenant du milieu de culture et/ou de leur propre VE) par les cellules pour satisfaire leur métabolisme.

	Préparation	Concentration totale (particules/mL de milieu)
CM-iPS	1	5,04E+08
	2	6,87E+08
	3	7,64E+08
	4	1,01E+09
milieu vierge	1	8,58E+08
	2	8,79E+08

Tableau 9 : Nombres de particules en fonction du volume de milieu conditionné ou vierge des CM-iPS obtenus par analyse au NanoSight.

A la suite de ces résultats, différents milieux et conditions de culture ont été testés pour remplacer ce milieu de culture inadapté pour l'étude des VE et augmenter le nombre de VE relarguées par les CM-iPS. Au total, trois milieux de culture ont été comparés :

- Nutristem (05-100-1B, Biological Industries) supplémenté de 1% PSA,
- William's E (A12176-01, Life Technologies) supplémenté du cocktail B (CM4000, Life Technologies), de 25 $\mu\text{g/mL}$ de gentamycine (15750, Life Technologies) et de 1 $\mu\text{g/mL}$

de FGF-2 de poisson zèbre (ou bFGF, *Fibroblast Growth Factor-basic*, GFZ1 Cell Guidance System, Cambridge, UK) : milieu utilisé pour la culture de Pg dérivés d'iPS (Pg-iPS) commercialisés par Cellular Dynamics International,

- DMEM supplémenté de 0.5% de BSA et de 1% PSA.

Les CM-iPS ont aussi été cultivés en milieu de culture iCell Cardiomyocytes Maintenance en tant que contrôle. Ces milieux ont été testés en normoxie et en hypoxie (3% d'oxygène) puisque l'hypoxie permet d'augmenter le nombre de VE sécrétées par les cellules (Ratajczak et al., 2006). Les cellules ont été cultivées pendant les 3 derniers jours de culture (jour 5 à 7) dans ces conditions sans changer de milieu de culture. Les milieux ont ensuite été collectés, ultracentrifugés et les culots de VE ont été resuspendus dans du PBS 1X filtré à 0.1 µm. De la même manière, les milieux vierges ont été ultracentrifugés et les culots, visibles ou non, ont été repris dans un minimum de volume de PBS. Pour chaque condition, le nombre de VE issues du milieu vierge a été soustrait au nombre de VE issues du MC afin de quantifier uniquement le nombre réel de VE provenant des CM-iPS. L'expérience a été réalisée une fois et chaque condition a été faite en duplicata.

Le nombre de cellules a été compté pour chaque condition en fin de culture (Tableau 10). L'hypoxie a entraîné une baisse drastique du nombre de cellules viables dans le milieu de maintenance des CM (passant de 71% à 14%). La viabilité des cellules cultivées en William's E + cocktail B est de 27% en normoxie et de 33% en hypoxie. Les milieux de cultures Nutristem et DMEM + 0.5% de BSA n'ont pas été adaptés pour la culture des CM-iPS, que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

Conditions de culture		Viabilité
iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium	Normoxie	71%
	Hypoxie	14%
William's E + cocktail B	Normoxie	27%
	Hypoxie	33%
Nutristem	Normoxie	~1%
	Hypoxie	N/A
DMEM + 0,5% BSA	Normoxie	~1%
	Hypoxie	N/A

Tableau 10 : Viabilité en fin de culture des cellules cultivées dans les différentes conditions testées.

L'analyse des différentes conditions de culture au NanoSight a montré que les CM-iPS sécrètent une faible quantité de VE dans chaque condition testée, que ce soit en hypoxie ou en normoxie (Figure 41). Le stress infligé aux cellules lors du changement de milieu, notamment pour les cultures en Nutristem et en William's E, n'a pas permis d'augmenter la sécrétion des VE par ces cellules. De plus, l'hypoxie ne s'est pas révélée efficace pour augmenter le nombre de VE sécrétées.

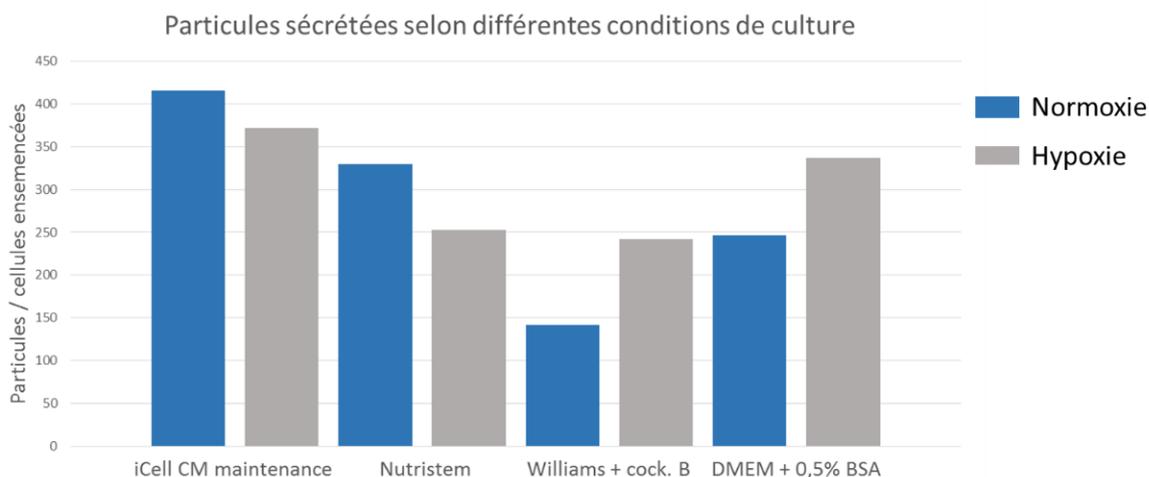


Figure 41 : Graphique représentant le nombre de particules libérées par CM-iPS ensemencés dans différentes conditions de culture et cultivés pendant trois jours.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

Après avoir constaté que les VE dérivées de Pg-CSEh peuvent récapituler les effets bénéfiques de leurs cellules mères dans un modèle murin d'ICC, des VE issues de différents types cellulaires ont été comparées afin de déterminer la meilleure source cellulaire pour la production de VE pour le traitement de l'ICC : CM battants pour analyser l'effet du stade de maturation de cellules cardiaques et CSM afin de comparer les VE dérivant d'un type cellulaire non cardiaque. L'effet thérapeutique de CM-iPS a aussi été évalué afin de comparer directement l'effet thérapeutique de ces cellules avec leurs VE.

Les CM-iPS et CSM ont montré une bonne viabilité en fin de culture. Le phénotype des CM-iPS a été confirmé par des immuno-marquages positifs pour les marqueurs MYH7, ACTN2 et TNNI3 et celui des CSM par la présence des marqueurs VIM et THY1 (ou CD90). Les VE totales sécrétées sur 24 heures de culture des cellules ont d'abord été caractérisées *in vitro* par NanoSight. Les profils des VE sécrétées par les deux types cellulaires ont montré des différences dans leur taille. En effet, les CM-iPS sécrètent davantage de particules ayant la taille d'exosomes (63% des VE totales) tandis que les CSM libèrent principalement des VE ayant la taille de MP (76% des VE totales).

La capacité thérapeutique des CM-iPS, de leurs VE et des VE dérivées de CSM a été étudiée dans le même modèle murin d'ICC que celui utilisé dans la première étude. Ces traitements ont été comparés à deux groupes de souris contrôles : l'un recevant du PBS 1X filtré à 0.1 μm et l'autre étant un groupe témoin d'injections (*sham*). Sept semaines après les injections, les différents traitements n'ont pas amélioré la fonction cardiaque des souris en ICC et l'évolution des paramètres dans chaque groupe est pratiquement identique, suggérant une amélioration inhérente aux capacités de récupération spontanée de la souris.

Les analyses complémentaires réalisées sur les milieux de culture ont révélé que le milieu des CM-iPS est très riche en VE et que la grande majorité des VE isolées à partir du MC provenait en fait de ce milieu. Ces cellules libéreraient donc une très faible quantité de VE qui expliquerait leur absence d'effet thérapeutique. Afin d'éliminer le biais lié à la présence de VE issues non

des cellules mais du milieu et d'établir si les CM-iPS pouvaient réellement sécréter par eux-mêmes des VE, différents milieux ont été testés pour remplacer ce milieu de culture inadapté. De plus, chaque milieu de culture a été testé en normoxie et en hypoxie dans le but d'augmenter la sécrétion des VE par ce type cellulaire. Malheureusement, aucune condition testée ne s'est montrée efficace dans la production d'un nombre suffisamment important de VE permettant d'évaluer leur potentiel thérapeutique *in vivo*.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le type cellulaire idéal pour la production de VE efficaces dans le traitement de l'ICC reste une question primordiale. Il a déjà été démontré que les VE libérées par de nombreux types cellulaires stimulent la réparation cardiaque, et cela inclue les cellules dérivées de cardiosphères (Gallet et al., 2017; Ibrahim et al., 2014; Tseliou et al., 2015), les CSE (Khan et al., 2015; Singla, 2016), les CSM (Arslan et al., 2013; Lai et al., 2010, 2011; Zhang et al., 2016) et les Pg (Barile et al., 2014). Ces études ont démontré que les VE dérivées de ces types cellulaires améliorent la fonction cardiaque et l'angiogenèse et diminuent la fibrose. Dans notre étude, nous avons choisi de comparer directement le potentiel thérapeutique de VE dérivées de CSM et de CM. En relation avec notre première étude démontrant les effets bénéfiques de VE dérivées de Pg-CSEh, l'injection de VE dérivées de CM dans le même modèle *in vivo* a permis de comparer l'efficacité des VE issues de cellules cardiaques à deux stades différents de maturation. Toutefois, la provenance des cellules thérapeutiques varie puisque les Pg sont dérivés de CSEh (première étude) alors que les CM sont différenciés à partir de cellules iPS. Bien que cette distinction puisse entraîner des différences d'efficacité thérapeutique, le passage à un type cellulaire dérivé de cellules iPS nous semblait justifié pour résoudre une partie des problèmes (approvisionnement, éthique) liés à l'utilisation des CSEh, tout en conservant comme source des cellules pluripotentes. De nombreuses études précliniques ont montré l'efficacité thérapeutique de CM à la fois dérivés de CSEh et d'iPS (Citro et al., 2014; van Laake et al., 2007) dans des modèles de pathologies ischémiques. Cependant, les effets de leurs VE sont mal décrits dans la littérature. Les VE issues de CSM ayant déjà démontré leur potentiel thérapeutique, elles ont directement été comparées aux VE dérivées de CM-iPS. Les effets des cellules déjà engagées vers la voie cardiaque semblent supérieurs à ceux des cellules non cardiaques dans le traitement de pathologies cardiaques (Fernandes et al., 2015; Menasché and Vanneaux, 2016), il était donc intéressant de savoir si cette supériorité s'appliquait aussi aux VE de ces cellules.

De manière inattendue, les injections de CM-iPS et de VE issues de ces mêmes cellules tout comme celles de CSM n'ont pas amélioré la fonction cardiaque des souris présentant une ICC. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ces résultats. 1) Les autres études ont mis en évidence les effets bénéfiques des VE de CSM libérées pendant 48 à 72 heures, alors

que dans notre étude, le MC est récupéré après 24 heures de culture. L'absence d'effet de ces VE pourrait donc s'expliquer par le fait que les VE ont été collectées après un temps de culture trop court et seraient en trop faible nombre pour avoir un effet positif sur la fonction cardiaque. 2) L'effet bénéfique des traitements pourrait être masqué par la récupération fonctionnelle naturelle de la souris immunodéficiente. 3) Les valeurs des données échographiques indiquent que la fonction cardiaque des souris est moins altérée dans cette étude que dans l'étude précédente. En effet, la moyenne pré-greffe du VTS est de 40.6 μ L, celle du VTD est de 69.8 μ L et celle de la FE est de 42.0% chez les souris injectées dans cette étude. En revanche, dans la première étude, celle du VTS est de 59.4 μ L (+18.8 μ L), celle du VTD est de 94.0 μ L (+24.2 μ L) et celle de la FE est de 37.5% (-4.5%). Or, il a été montré que l'amélioration après une thérapie cellulaire est d'autant plus marquée que la fonction cardiaque était initialement plus altérée. Aussi une deuxième analyse a-t-elle été réalisée en sélectionnant uniquement les souris dont la fonction cardiaque était le plus altérée avec au moins deux des trois critères suivant : FE < 45%, VTS > 40 μ L ou VTD > 70 μ L. Bien que la p-value de l'analyse soit diminuée, aucune différence significative n'a été retrouvée, ce qui tend à invalider l'hypothèse qui ferait de la relativement faible altération de la fonction cardiaque de base la cause des résultats neutres qui ont été observés.

Peu d'études suggèrent que les CM libèrent des VE (Gupta and Knowlton, 2007; Malik et al., 2013). Dans nos expériences, les VE isolées des MC de CM-iPS cultivés en milieu de maintenance (iCell Cardiomyocytes Maintenance, sur les recommandations de Cellular Dynamics International) proviennent principalement du milieu de culture et non des cellules. Cette constatation pourrait expliquer les effets nuls retrouvés *in vivo* sur la fonction cardiaque des souris traitées avec les VE de CM-iPS, et par extension, avec les CM-iPS. Différents milieux de culture ont alors été testés afin de remplacer ce milieu de culture inadéquat pour l'étude des VE. De plus, les CM-iPS ont aussi été cultivés en condition hypoxique dans le but de stimuler la sécrétion des VE (Ratajczak et al., 2006). La culture des cellules en hypoxie aurait d'autres avantages. Il a déjà été démontré que l'hypoxie est capable d'augmenter le bénéfice fonctionnel de cellules thérapeutiques pour la régénération cardiaque (Kim et al., 2009; Tang et al., 2009; Uemura et al., 2006). Ce bénéfice est retrouvé avec les VE sécrétées par des Pg cardiaques cultivés en hypoxie où les VE sont capables de stimuler l'angiogenèse ce qui laisse à penser que des voies de signalisation telles que celles qui impliquent les facteurs induits

par l'hypoxie (HIF-1, *Hypoxia Inducible Factor*), joueraient un rôle (Agarwal et al., 2017; Kim et al., 2009). Une autre étude a confirmé ces résultats en montrant que des VE dérivées de Pg cultivés en hypoxie ont un meilleur potentiel régénérateur par rapport à celles dérivées de Pg cultivés en normoxie, à la fois *in vitro* où les VE hypoxiques ont un potentiel pro-angiogénique augmenté et inhibent certaines protéines extracellulaires impliquées dans le remodelage cardiaque, et *in vivo* où elles améliorent la fonction cardiaque et diminuent la fibrose dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat (Gray et al., 2015). De manière intéressante, l'hypoxie induit un changement du contenu en miARN des VE (Agarwal et al., 2017; Gray et al., 2015). Les VE issues de conditions hypoxiques sont enrichies en miARN impliqués dans des effets régénérateurs et, au contraire, les niveaux d'expression de miARN impliqués dans des effets néfastes pour le cœur en IC (anti-angiogéniques, pro-apoptotiques, pro-fibrotiques) sont diminués. Cette observation pourrait suggérer un réel mécanisme d'emballage spécifique des miARN selon les conditions environnementales (Ogawa et al., 2013; Villarroya-Beltri et al., 2013). Cependant, aucune condition testée n'a permis une augmentation significative de la sécrétion de VE par les CM-iPS. Le nombre de particules libérées par ces cellules varie de 142 à 336 particules/CM-iPS selon les conditions alors qu'il est de 1338 particules/Pg-CSEh (première étude). Cette différence drastique ne permet pas d'évaluer l'effet des VE de CM-iPS dans un modèle *in vivo* avec une probabilité raisonnable de succès, bien qu'on ne puisse pas exclure que l'injection d'un nombre beaucoup plus élevé de ces VE pourrait avoir un effet thérapeutique. Il faut aussi noter que l'hypoxie a été induite à un taux d'oxygène de 3%. Les autres études qui ont montré un effet positif de la culture de cellules en hypoxie ont utilisé généralement un taux d'oxygène de 1%. Cette différence pourrait avoir un impact sur la quantité et la qualité des VE relarguées. Une autre technique afin de stimuler la libération des VE par les CM est de cultiver les cellules en présence d'éthanol. Il a été montré que des CM cultivés dans cette condition libèrent significativement plus de VE qu'après hypoxie sans affecter la stabilité des VE (Malik et al., 2013). Il serait ainsi intéressant de tester cette autre méthode. D'une manière rétrospective, le milieu vierge utilisé pour la culture des Pg-CSEh dans la première étude (α MEM + sérum B27) a été analysé par NanoSight et la quantité de particules provenant du milieu a été considérée comme négligeable.

Cette étude souligne l'importance d'analyser le milieu de culture vierge avant toute expérimentation et de choisir un milieu pauvre en particules pour une évaluation non biaisée

des VE dérivées de cellules thérapeutiques. Il est également important de mettre en place des tests fonctionnels *in vitro* afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des VE sécrétées dans une condition donnée avant de les tester dans un modèle animal. Cette pré-sélection basée sur les résultats *in vitro* est scientifiquement logique et éthiquement justifiée puisqu'elle permet d'obéir à la règle des 3R en évitant la multiplication d'expériences à la probabilité de succès limitée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA TROISIEME PARTIE

Agarwal, U., George, A., Bhutani, S., Ghosh-Choudhary, S., Maxwell, J.T., Brown, M.E., Mehta, Y., Platt, M.O., Liang, Y., Sahoo, S., et al. (2017). Experimental, Systems, and Computational Approaches to Understanding the MicroRNA-Mediated Reparative Potential of Cardiac Progenitor Cell-Derived Exosomes From Pediatric Patients Novelty and Significance. *Circ. Res.* *120*, 701–712.

Arslan, F., Lai, R.C., Smeets, M.B., Akeroyd, L., Choo, A., Agnor, E.N.E., Timmers, L., van Rijen, H.V., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., et al. (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* *10*, 301–312.

Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *103*, 530–541.

Citro, L., Naidu, S., Hassan, F., Kuppusamy, M.L., Kuppusamy, P., Angelos, M.G., and Khan, M. (2014). Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PloS One* *9*, e116281.

Fernandes, S., Chong, J.J.H., Paige, S.L., Iwata, M., Torok-Storb, B., Keller, G., Reinecke, H., and Murry, C.E. (2015). Comparison of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, Cardiovascular Progenitors, and Bone Marrow Mononuclear Cells for Cardiac Repair. *Stem Cell Rep.* *5*, 753–762.

Gallet, R., Dawkins, J., Valle, J., Simsolo, E., de Couto, G., Middleton, R., Tseliou, E., Luthringer, D., Kreke, M., Smith, R.R., et al. (2017). Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur. Heart J.* *38*, 201–211.

Gray, W.D., French, K.M., Ghosh-Choudhary, S., Maxwell, J.T., Brown, M.E., Platt, M.O., Searles, C.D., and Davis, M.E. (2015). Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ. Res.* *116*, 255–263.

Gupta, S., and Knowlton, A.A. (2007). HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *292*, H3052–H3056.

Ibrahim, A.G.-E., Cheng, K., and Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* *2*, 606–619.

Karantalis, V., and Hare, J.M. (2015). Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease. *Circ. Res.* *116*, 1413.

Khan, M., Nickoloff, E., Abramova, T., Johnson, J., Verma, S.K., Krishnamurthy, P., Mackie, A.R., Vaughan, E., Garikipati, V.N.S., Benedict, C., et al. (2015). Embryonic stem cell-derived

exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ. Res.* 117, 52–64.

Kim, H.W., Haider, H.K., Jiang, S., and Ashraf, M. (2009). Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 284, 33161–33168.

van Laake, L.W., Passier, R., Monshouwer-Kloots, J., Verkleij, A.J., Lips, D.J., Freund, C., den Ouden, K., Ward-van Oostwaard, D., Korving, J., Tertoolen, L.G., et al. (2007). Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 1, 9–24.

Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4, 214–222.

Lai, R.C., Chen, T.S., and Lim, S.K. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen. Med.* 6, 481–492.

Malik, Z.A., Kott, K.S., Poe, A.J., Kuo, T., Chen, L., Ferrara, K.W., and Knowlton, A.A. (2013). Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H954-965.

Menasché, P., and Vanneaux, V. (2016). Stem cells for the treatment of heart failure. *Curr. Res. Transl. Med.* 64, 97–106.

Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M., and Yanoshita, R. (2013). Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 66–75.

Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487–1495.

Singla, D.K. (2016). Stem cells and exosomes in cardiac repair. *Curr. Opin. Pharmacol.* 27, 19–23.

Tang, Y.L., Zhu, W., Cheng, M., Chen, L., Zhang, J., Sun, T., Kishore, R., Phillips, M.I., Losordo, D.W., and Qin, G. (2009). Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ. Res.* 104, 1209–1216.

Tseliou, E., Fouad, J., Reich, H., Slipeczuk, L., Couto, G. de, Aminzadeh, M., Middleton, R., Valle, J., Weixin, L., and Marbán, E. (2015). Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming With Cardiosphere-Derived Extracellular Membrane Vesicles. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 599–611.

Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N., and Ashraf, M. (2006). Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ. Res.* 98, 1414–1421.

Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4.

Zhang, Z., Yang, J., Yan, W., Li, Y., Shen, Z., and Asahara, T. (2016). Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002856.

QUATRIÈME PARTIE : EVALUATION DES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES ISSUES DE PROGÉNITEURS CARDIOVASCULAIRES DÉRIVÉS DE CELLULES SOUCHES HUMAINES INDUITES À LA PLURIPOTENCE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

L'étude précédente du laboratoire a montré que le choix du type cellulaire et le stade de maturation des cellules sont des paramètres importants dans la production de VE efficaces pour le traitement de l'ICC. Puisque les VE dérivées de CM-iPS et de CSM n'ont pas eu d'effet sur la fonction cardiaque des souris présentant une ICC, nous avons choisi de revenir au type cellulaire de départ, les Pg, pour la production des VE, car des effets bénéfiques et encourageants avaient été observés sur la fonction cardiaque des souris traitées avec des Pg-CSEh et leurs VE (première étude). Toutefois, la source de cellules pluripotentes pour la génération des Pg a été remplacée par des cellules iPS. Ces Pg-iPS, provenant directement de la compagnie Cellular Dynamics International, présentent des avantages techniques par rapport aux Pg dérivés de CSEh : 1) un approvisionnement mieux contrôlé, 2) une simplification de la culture, et 3) des cultures cellulaires, donc des productions de VE, plus reproductibles. De plus, l'utilisation de cellules dérivées d'iPS aurait un réel impact en clinique en permettant de contourner le problème éthique associé à l'utilisation de CSE. Ce changement devrait également permettre de confirmer l'efficacité des VE provenant d'un autre type cellulaire, confortant ainsi les données déjà obtenues dans la première partie de ma thèse.

Afin de confirmer la qualité des VE produites en termes d'efficacité thérapeutique, des tests fonctionnels *in vitro* ont été développés par notre laboratoire. Ces tests ont servi de contrôles-qualité des VE avant leur injection chez l'animal pour en étudier les bénéfices *in vivo* mais ont aussi permis d'étudier les mécanismes par lesquels les VE pourraient agir. Nous avons étudié la survie cellulaire, l'angiogenèse, la prolifération des CM et la transdifférenciation de fibroblastes en CM.

Une fois leur potentiel thérapeutique validé *in vitro*, les VE dérivées de Pg-iPS ont été injectées dans le même modèle murin d'ICC. Des Pg-iPS ont aussi été injectés afin de comparer directement leurs effets avec ceux de leurs VE. Comme dans l'étude précédente les souris étaient moins atteintes, des IDM plus massifs ont été réalisés et les critères d'inclusion ont été modifiés pour sélectionner les souris les plus touchées. L'efficacité des CM-iPS dans les cardiopathies ischémiques, déjà démontrée par plusieurs études (Citra et al., 2014; van Laake et al., 2007), a également été évaluée *in vivo*. L'objectif est de comparer l'effet thérapeutique en fonction du stade de maturation de cellules engagées dans la voie cardiaque. En revanche, compte-tenu de l'observation que les CM-iPS sécrètent une très faible quantité de VE, les VE dérivées de ce type cellulaire n'ont été étudiées ni *in vitro* ni *in vivo* dans cette étude. L'efficacité thérapeutique des différents traitements a été évaluée par échographie, et analyses histologiques et transcriptomiques sur les cœurs de souris. Dans un but mécanistique, le contenu en miARN des Pg-iPS et de leurs VE a été comparé.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Culture et caractérisation des cellules

a) *Culture des Pg-iPS*

Les Pg-iPS ont directement été achetés à l'entreprise Cellular Dynamics International (iCell Cardiac Progenitor Cells, CPC-301-020-001-PT, CDI). Les Pg-iPS congelés en cryotube sont décongelés selon les recommandations du fournisseur et sont ensemencés à raison de 78 000 cellules/cm² sur des flasques coatées à la fibronectine (11051407001, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA). Les cellules sont incubées à 37°C et 7% de CO₂ dans du milieu de culture William's E (A12176-01, Life Technologies, Saint-Aubin, France) supplémenté du Cocktail B (CM4000, Life Technologies), de 25 µg/mL de gentamycine (15750, Life Technologies) et de 1 µg/mL de FGF-2 de poisson zèbre (GFZ1 Cell Guidance System) pendant 4 jours. Cette méthode de culture permet la prolifération des Pg-iPS et le maintien de leur phénotype (un autre protocole est disponible permettant la maturation des Pg en CM). Au deuxième jour de culture (J2), le MC est collecté, soumis à faible centrifugation à 1200 rpm pendant 6 minutes pour enlever les débris cellulaires et congelé (les VE pourront être collectées ultérieurement par ultracentrifugation et serviront à l'optimisation des tests fonctionnels) et du milieu frais est rajouté. Deux jours plus tard, soit au quatrième jour de culture (J4), le MC est récupéré, soumis à faible centrifugation comme précédemment, et est ultracentrifugé pour en collecter les VE totales sécrétées sur les deux derniers jours de culture.

b) *Culture des CM-iPS*

La culture des CM-iPS a été faite de la même façon que décrite précédemment (voir p.140). Le MC n'est pas récupéré puisque les VE ne sont pas étudiées *in vitro* ou *in vivo*.

c) *Caractérisation des Pg-iPS et des CM-iPS*

A la fin de la culture, les cellules sont trypsinées, récupérées et cytopspinées (Cytospun 4, Fisher Scientific, Illkirch, France) à 2 000 rpm pendant 5 minutes à une concentration de 5 000 cellules par lame. Elles sont fixées au PFA à 4% et caractérisées par immunohistochimie pour les marqueurs de mésoderme précoces tels que MEF2C (dilution 1/50, ab79436, Abcam), ISL1

(dilution 1/500, ab20670, Abcam) et NKX2.5 (dilution 1/50, ab35842, Abcam) et de CM matures tels que TNNI3 (dilution 1/200, ab52862, Abcam), ACTN2 (dilution 1/500, A7811, Sigma Aldrich) et MYH7 (dilution 1/10, MAB1552, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). De plus, l'ARN est extrait à partir de culots de Pg-iPS et CM-iPS grâce au kit RNeasy Mini (74104, Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. L'expression des gènes associés à la pluripotence (NANOG, SOX2, OCT3/4), aux Pg cardiaques (ISL1, MEF2C, NKX2.5, GATA4) et aux CM matures (TBX20, TNNT2, PLN, MYH6, MYH7, MYL2) a été évaluée par qPCR, en prenant comme référence le gène de ménage GAPDH (Tableau 11).

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
NANOG	CTCAGCTACAAACAGGTGAAGA	GAGTAAAGGCTGGGGTAGGT
SOX2	AGGAGTTGTCAAGGCAGAGAA	TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCA
OCT3/4	ATCAAGCAGCGACTATGCAC	CCAGAGGAAAGGACACTGGT
ISL1	CCAGTCCAGAGAGACACGAC	AATTGACCAGTTGCTGAAAAGC
MEF2C	ATACCAGTGGGTGGGAAAGG	GTTGCTGAGGCAAATTGCAG
NKX2.5	ATGGTATCCGAGCCTGGTAG	ATGCAAATCCAGGGGACTC
GATA4	GACACCCCAATCTCGATATGTT	GTTGCACAGATAGTGACCCG
TBX20	GCAGGAGGATGTTTCCAACC	GGACGATGTCCATCAGGACT
TNNT2	AATAGAGCCTGGCCTCCTTC	CCCCATTTCCAAACAGGAGC
PLN	CAGCTGCCAAGGCTACCTAA	CAGCAGGACAGGAAGTCTGA
h/MYH6	TGACATTGGTGCCAAGCAAA	GTTGGCAAGAGTGAGGTTCC
h/MYH7	AAAGGTCAAGGCCTACAAGC	TGTGGCAAAGCTACTCCTCAT
MYL2	GGGTGCTGAAGGCTGATTAC	GGTCAACCTCCTCCTTGAA

Tableau 11 : Séquences des primers utilisés en qPCR dans la caractérisation des Pg-iPS et CM-iPS

La caractérisation par qPCR a été réalisée par Yeranuhi Hovhannisyann, doctorante dans le laboratoire du Pr Onnik Agbulut, équipe « Cellules Souches et Biothérapies » à l'Institut de Biologie Paris Seine.

2. Isolation et caractérisation des vésicules extracellulaires

a) Préparation par ultracentrifugation

Comme décrit dans la première étude, les MC sont ultracentrifugés à 99 855 g (37 500 rpm, rotor 60Ti, Beckman Coulter) pendant 16 heures à 4°C, avec accélération et décélération au maximum, ce qui permet de collecter les VE totales libérées par les cellules (exosomes, MP et corps apoptotiques). Le surnageant est éliminé et les VE sont ensuite reprises dans du PBS 1X filtré à 0.1 µm dans le même volume que celui de leurs cellules mères. Le milieu vierge est également ultracentrifugé afin de s'assurer qu'il ne contient pas un nombre trop important de VE qui pourrait biaiser les analyses des VE dérivées de Pg-iPS.

b) Caractérisation des vésicules extracellulaires

Les VE dérivées des Pg-iPS et du milieu vierge sont caractérisées par NanoSight comme expliqué précédemment (voir p.79). Les analyses ont été faites dans notre laboratoire après l'acquisition d'un NanoSight LM14 (Malvern). Les réglages de l'appareil ont été modifiés de la manière suivante : niveau de caméra (*camera level*) à 15 et seuil de détection (*threshold*) des particules à 3 ou 4 selon l'aspect de l'échantillon. Pour chaque échantillon, deux dilutions sont réalisées et les données obtenues sont moyennées. Chaque dilution est analysée par 5 enregistrements de 60 secondes. Les VE de Pg-iPS ont aussi été visualisées par cryo-MET afin d'observer leur morphologie et leur intégrité et la présence d'exosomes a été confirmée par Western blot. La caractérisation par Western blot a été réalisée par Nadia El Harane, doctorante au sein de notre équipe de recherche (données non présentées).

3. Tests fonctionnels des vésicules extracellulaires

Différents tests *in vitro* ont été développés afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de VE, issues d'un type cellulaire en particulier ou dont les cellules ont été cultivées de manière différente (hypoxie, changement de milieu, retrait du sérum, etc.) qui pourraient affecter leurs effets bénéfiques. Les buts étaient de confirmer la capacité thérapeutique des VE *in vitro* avant de les évaluer dans un modèle *in vivo*, permettant d'obéir à la règle des 3R (réduction du nombre d'animaux) et d'identifier les mécanismes par lesquels les VE pourraient induire ces effets

thérapeutiques. Les tests sur la prolifération cellulaire et la transdifférenciation ont été réalisés au Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute à La Jolla en Californie, équipe de recherche dirigée par le Pr Mark Mercola et le Dr Alex Colas. Ces voyages ont été possibles grâce à l'obtention de deux bourses doctorales de mobilité internationale (voyages de 6 semaines et 3 mois).

a) *Test de viabilité*

Des H9c2 immortalisés de rat (myoblastes cardiaques) sont ensemencés sur une plaque 6 puits préalablement coatée à la gélatine à 0.2% à une densité de 25 000 cellules/cm² et cultivés dans du Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) + glutamax (10566-016, Gibco, Waltham, MA, USA) supplémenté avec 10% de SVF (S1810, Biowest) et 1% de pénicilline/streptomycine/amphotérycine (PSA, A5955, Sigma Aldrich) à 37°C et 5% de CO₂. Après 48 heures de culture, les cellules de deux puits (duplicata) sont comptées à l'aide de l'analyseur de cellules Muse™ (0500-3115, Merck Millipore, Guyancourt, France) selon les recommandations du fournisseur ce qui indique le nombre de cellules viables au début du test (t₀). Le milieu de culture des autres puits est remplacé par différents milieux selon les conditions :

- Contrôle positif : milieu complet (DMEM + glutamax + 10% SVF + 1% PSA),
- Contrôle négatif : milieu pauvre (DMEM + glutamax + 1% PSA),
- Contrôle interne au laboratoire (DMEM + glutamax + VE isolées de SVF pur + 1% PSA),
- Evaluation du potentiel des VE sur le maintien de la viabilité des H9c2 (DMEM + glutamax + VE dérivées de Pg-iPS à différentes concentrations + 1% PSA).

Vingt-sept heures plus tard, les cellules viables de chaque condition sont comptées au Muse™ en duplicata (réplicats techniques) et les valeurs sont moyennées (T₂₇). Le pourcentage de viabilité est calculé selon la formule : $100\% \times \frac{(t_{27}-t_0)}{t_0}$. L'analyse des différentes concentrations de VE a été réalisée trois fois en utilisant trois préparations différentes de VE dans trois tests indépendants (réplicats biologiques).

b) *Tests d'angiogénèse*

Deux tests différents ont été développés : le test de cicatrisation et l'évaluation de la formation de tubes.

Test de cicatrisation :

Des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC, C-12200, PromoCell, Heidelberg, Allemagne) sontensemencées à une densité de 41 667 cellules/cm² sur une plaque 96 puits et cultivées dans du milieu de culture Endothelial Cell Growth (C-22210, PromoCell) supplémenté de Endothelial Cell Growth Medium Supplement (C-39210, Promocell) à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, les cellules sont à confluence et une cicatrice est réalisée dans la monocouche de cellules à l'aide d'un cône de 10 µL (t₀). Les cellules sont cultivées pendant 24 heures dans différents milieux de culture selon les conditions :

- Contrôle positif : milieu complet (milieu Endothelial Cell Growth + Endothelial Cell Growth Medium Supplement),
- Contrôle négatif : milieu pauvre (milieu Endothelial Cell Growth Medium),
- Contrôle interne au laboratoire (milieu Endothelial Cell Growth Medium + VE isolées de SVF pur),
- Evaluation du potentiel des VE sur la capacité de cicatrisation (milieu Endothelial Cell Growth Medium + VE dérivées de Pg-iPS à différentes concentrations).

Un suivi de l'évolution de la cicatrice est réalisé grâce à un microscope inversé en temps réel (Nikon-ECLIPSE Ti, Nikon Corporation, Tokyo, Japon). Des images de chaque puits sont prises toutes les 6 heures pendant 24 heures (t₆, t₁₂, t₁₈, t₂₄). L'aire de la cicatrice est déterminée à chaque temps grâce au logiciel ImageJ (v.1.50i). Le pourcentage de cicatrisation est calculé grâce à la formule : $100\% \times \frac{(tx-t_0)}{t_0}$. Chaque condition est réalisée en triplicata (réplicats techniques). Le test de cicatrisation a été répété trois fois en utilisant trois préparations différentes de VE (réplicats biologiques) et différentes doses de VE.

Evaluation de la formation de tubes :

Des HUVEC sontensemencées sur une matrice acellulaire de type Matrigel déplétée en facteurs de croissance (Matrigel Growth Factor Reduced, 354230, BD Sciences, Erembodegem,

Belgium) à une densité de 41 667 cellules/cm² et sont cultivés à 37°C et 5% CO₂. Elles sont cultivées dans différents milieux de culture selon les conditions testées (mêmes conditions que le test de cicatrisation). Les cellules sont cultivées pendant 24 heures et des images sont prises à 18 heures et à 24 heures de culture afin d'observer l'évolution des cellules endothéliales. Leur capacité à former des tubes est évaluée par ImageJ (v.1.50i) en utilisant l'analyseur Angiogenèse qui permet d'analyser le réseau de tubes formé en déterminant la longueur des segments formés et le nombre de connections des tubes entre eux. Chaque condition est testée en triplicata (réplicats techniques) et l'analyse de la formation des tubes selon une gamme de concentrations de VE a été reproduite trois fois en utilisant trois préparations indépendantes de VE (réplicats biologiques).

c) *Effet sur la prolifération cellulaire*

Les CSEh sont différenciées en CM selon le protocole de Burr ridge (Burr ridge et al., 2014). Les CM battants sont cultivés sur plaque 384 puits (781091, Greiner Bio-One, Monroe, LA, USA) coatée préalablement au Matrigel (356231, Corning, New York, USA) à une densité de 10 000 cellules/puits dans du milieu de culture DMEM (10-013-CV, Corning) supplémenté de 2% KOSR (10828028, Life Technologies), de 2% de sérum B27 50X sans vitamine A (12587-010, minus Vitamin A, Life Technologies) et de 1% de pénicilline/streptomycine (15140122, Life Technologies). Au 24^{ème} jour de maturation des CM, les VE sont incubées à différentes doses à 37°C et 5% CO₂. Quarante-huit heures plus tard, la prolifération des CM est évaluée grâce au kit Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging (C10337, Life Technologies). L'EdU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine) est un nucléotide analogue à la thymidine qui est incorporé dans l'ADN lorsque la cellule se divise. Grâce à une réaction enzymatique, ce nucléotide devient fluorescent et les cellules en prolifération peuvent être comptées. L'EdU est ajouté à une concentration finale de 10 µM par puits pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite fixées au PFA à 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au PBS 1X, les sites aspécifiques sont bloqués et les cellules sont perméabilisées grâce à une solution composée de 3% de BSA, 0.1% de triton et 0.2% de glycine. L'EdU est révélé grâce à une réaction enzymatique selon les recommandations du fournisseur. Le phénotype des CM est confirmé avec un marquage anti- α -actinine (dilution au 1/800, A7811, Sigma Aldrich) pendant 2 heures à température ambiante sous faible agitation ou à 4°C sur la nuit puis l'Ac secondaire couplé à l'Alexa Fluor 568 (dilution au 1/500, A11004, Life Technologies) est incubé avec du DAPI (dilution 1/1000,

D9542-5MG, Sigma Aldrich) pendant 1 heure à température ambiante sous faible agitation. La plaque est analysée et les résultats sont générés à l'aide du microscope ImageXpress Micro XLS (Widefield High-Content Analysis System, Molecular Devices). Une cellule est considérée positive lorsqu'elle exprime les 3 marquages (DAPI, EdU et α -actinine). Chaque condition est répétée en triplicata (réplicats techniques). Au total, cinq préparations différentes de VE à J2 et à J4 de culture ont été testées dans deux expériences indépendantes.

d) *Effet sur la transdifférenciation*

L'effet des VE sur la transdifférenciation de fibroblastes en CM a été étudié en incubant des VE avec des fibroblastes murins génétiquement modifiés qui, en présence de doxycycline, surexpriment les 3 facteurs de différenciation Mef2c, Gata4, Tbx5, permettant aux fibroblastes de se différencier en CM. Les CM générés fluorescent en vert, la GFP étant sous le contrôle du promoteur du gène α MHC (*α -myosin heavy chain*) spécifique des CM. Ces fibroblastes murins ont été généreusement fournis par le laboratoire du Pr Qian de l'*University of North California*. Un jour après décongélation, les fibroblastes sontensemencés sur plaque 384 puits (781091, Greiner Bio-One) coatée à la gélatine à 0.1% (7903, Stemcell Technologies, Seattle, WA, USA) à une densité de 2000 cellules/puits et cultivés dans du milieu DMEM high glucose (D5796, Sigma Aldrich) supplémenté de 10% SVF et de 1% de pénicilline/streptomycine (15140122, Life Technologies). Les VE sont ajoutées à différentes doses et la plaque est incubée à 37°C et 5% CO₂. Vingt-quatre heures plus tard, la doxycycline est ajoutée à une concentration de 1 mg/mL (D3072, Sigma Aldrich) dans chaque puits à l'exception du contrôle négatif et le milieu de culture est changé par StemPro-34 SF medium (SPF34, Gibco) supplémenté de 10 μ l/ml de GlutaMAX (Gibco), de 50 μ g/ml d'acide ascorbique (Sigma Aldrich), de 5 ng/ml de VEGF165 recombinant humain (*Vascular endothelial growth factor*, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), de 10 ng/ml de FGF basic 146aa recombinant humain (R & D Systems) et de 50 ng/ml de FGF10 recombinant humain (R & D Systems). Soixante-douze heures plus tard, les cellules sont fixées avec 4% de PFA et le noyau des cellules est marquées au DAPI (dilution 1/1000, D9542-5MG, Sigma Aldrich). L'acquisition des images et l'analyse des données sont réalisées à l'aide du microscope ImageXpress Micro XLS (Widefield High-Content Analysis System, Molecular Devices). Au total, 4 expériences indépendantes utilisant 6 préparations différentes de VE à J2 et J4 de culture ont été réalisées.

e) *Internalisation des vésicules extracellulaires*

Afin de confirmer l'internalisation des VE par les cellules cibles, les VE ont été marquées à la calcéine-AM. Cette molécule hydrophobe non fluorescente peut traverser les membranes lipidiques des cellules et des VE. Lorsqu'elle est en présence d'estérases fonctionnelles à l'intérieur des cellules et VE, ces dernières vont cliver le précurseur le rendant fluorescent et hydrophile et le signal fluorescent (vert) est piégé dans les cellules et VE.

Marquage des VE :

La calcéine-AM (C3100MP, Life Technologies) est dissoute dans du DMSO (P60-36720100, Dominique Dutscher, Brumath, France) à une concentration finale de 1 mM. Le MC récupéré est incubé avec 2 μ M de calcéine-AM à 37°C pendant 1 heure. Il est ensuite ultracentrifugé à 99 855 g (37 500 rpm, rotor 60Ti, Beckman Coulter) pendant 16 heures à 4°C comme décrit précédemment. Le surnageant est enlevé, le culot de VE est resuspendu dans du PBS 1X filtré à 0.1 μ m et 17 mL de PBS frais est ajouté dans le tube. Une seconde ultracentrifugation à 99 855 g pendant 3 heures à 4°C est réalisée qui permet de laver le culot de VE et d'enlever les éventuelles traces de calcéine-AM libre qui pourraient potentiellement marquer directement les cellules. Le culot de VE est resuspendu dans du PBS 1X filtré à 0.1 μ m. Le surnageant du lavage est conservé en tant que contrôle pour une possible contamination de calcéine-AM libre. Le marquage des VE est confirmé par CMF (Cytomètre ImageStream^x MkII, Merck Millipore) (voir ci-dessous).

Test d'internalisation :

Le test de survie cellulaire a été utilisé pour déterminer si les VE marquées à la calcéine-AM sont internalisées par les H9c2. La lignée cellulaire H9c2 est cultivée dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais la durée du test a été raccourcie à 20 heures. A t_0 , le milieu de culture de chaque condition est changé selon les différentes conditions du test :

1. Milieu complet (contrôle positif),
2. Milieu pauvre (contrôle négatif),
3. Milieu pauvre supplémenté de 5×10^9 VE dérivées de SVF non marquées,
4. Milieu pauvre supplémenté de 5×10^9 VE de Pg-iPS marquées à la calcéine-AM,

5. Milieu pauvre supplémenté de 5×10^9 VE de Pg-iPS non marquées,
6. Milieu pauvre supplémenté du PBS ayant servi au lavage lors de la seconde ultracentrifugation (même volume que celui des VE marquées à la calcéine pour comparer au mieux cette potentielle contamination).

De plus, des cellules cultivées en milieu pauvre supplémenté avec des VE dérivées de SVF ont été directement marquées avec $2 \mu\text{M}$ de calcéine-AM pendant 20 heures (condition 7) ou pendant la dernière heure du test de viabilité (condition 8) en tant que contrôle de marquage. Les cellules marquées sont récupérées à la fin du test de viabilité et directement analysées par CMF afin de détecter la fluorescence verte de la calcéine-AM. L'internalisation des VE par les cellules H9c2 est ensuite analysée par microscopie confocale (voir ci-dessous).

Confirmation du marquage par CMF :

Le cytomètre ImageStream^x MkII permet de visualiser les VE et les cellules marquées à la calcéine-AM et de quantifier l'intensité de fluorescence de chaque événement. Un zoom optique de 60x est appliqué pour les VE et de 40x pour les cellules. L'acquisition des événements est réalisée à l'aide du logiciel INSPIRE (Merck Millipore). Au total, un minimum de 15 000 événements est acquis pour chaque échantillon. Les canaux sont réglés de la manière suivante : « channel 01 = bright field ; channel 06 = SSC (side scatter, 785 nm) ; channel 02 = laser 488 nm ». Pour la confirmation du marquage des VE, les événements sont d'abord triés selon la diffusion de la lumière (SSC, *Side-scattered light*) puis leur fluorescence est évaluée par le canal 02 avec un laser réglé à 80 mW. Pour l'analyse des cellules à la fin du test de viabilité, elles sont triées selon leur morphologie, puis selon leur mise au point au microscope et enfin évaluées par le canal 02 fluorescent dont le laser est réglé à 10 mW sauf pour les conditions 7 et 8 où il est réglé à 0.25 mW (fluorescence des cellules directement marquées très forte). Les résultats sont analysés grâce au logiciel IDEAS (Merck Millipore). Ces expériences ont été reproduites trois fois en utilisant trois différentes productions de VE.

Microscopie confocale :

Les cellules H9c2 sont cultivées sur des lames de type IBIDI® en verre de 12 puits (81201, Biovalley, Nanterre, France). Après marquage des VE avec $2 \mu\text{M}$ de calcéine-AM pendant 1 heure et confirmation du marquage par ImageStream, les VE sont incubées avec les cellules

H9c2 pendant 20 heures. Les cellules sont ensuite fixées au PFA à 1% pendant 10 minutes puis deux lavages au PBS sont réalisés pendant 5 minutes. La membrane des cellules est marquée à l'agglutinine de germe de blé couplée à la tétraméthylrhodamine (TRITC) (*Wheat Germ Agglutinin-TRITC*, WGA, dilué au 1/5000 dans du DMEM, lectine dérivée de *Triticum vulgare*, CliniScience) pendant 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Trois lavages au PBS sont effectués puis le noyau des cellules est marqué avec du DAPI (dilution au 1/3750, 268298, Calbiochem, Fontenay-sous-Bois, France) pendant 3 minutes dans les mêmes conditions. Après trois lavages au PBS, les lames sont montées avec une lamelle en verre à l'aide du milieu de montage fluorescent Dako (*Dako Fluorescence Mounting Medium*, Dako Cytomation, Glostrup, Danemark). Les lames sont visualisées par microscopie confocale (Leica TCS SP8, Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne) à l'aide du logiciel LAS (Leica microsystems) avec un objectif à 63x.

4. Evaluation de l'effet thérapeutique des vésicules extracellulaires *in vivo*

a) *Injection des vésicules extracellulaires chez la souris insuffisante cardiaque*

L'efficacité thérapeutique des différents traitements est évaluée dans le même modèle murin d'ICC que les études précédentes et suit le même schéma expérimental (IDM, échographies pré-greffes, administration des traitements par injections transcutanées guidées par échographie, échographies post-greffes, voir p.90).

Dans cette étude, on distingue quatre groupes de traitement :

- 1) PBS 1X filtré à 0.1 μm en tant que contrôle,
- 2) CM-iPS pour analyser, par comparaison avec le groupe suivant, la capacité thérapeutique en fonction du stade de maturation de cellules cardiaques,
- 3) Pg-iPS afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique des Pg dérivés d'une source de cellules pluripotentes différente des CSE (iPS),
- 4) VE dérivées de Pg-iPS dans le but de confirmer l'équivalence fonctionnelle entre progéniteurs et VE qu'ils sécrètent.

Dans cette étude expérimentale, les souris ont été séparées en deux grandes séries d'animaux. Les critères d'inclusion ont été modifiés par rapport aux études précédentes de manière à sélectionner des souris dont la fonction cardiaque est plus altérée pour améliorer la probabilité d'observer un effet. Les souris sont sélectionnées de façon à avoir au moins deux des trois critères suivant : VTS > 40 μ L, VTD > 70 μ L et FE < 45%. Les souris ont été réparties dans les différents groupes de traitement de façon à ce que les paramètres cardiaques pré-greffes soient homogènes entre les groupes. Pour les productions de cellules supérieures à celle attendue, ces cellules et/ou les VE restantes ont été administrées aux souris les plus atteintes présentant au moins l'un des trois critères précédents. Les différents traitements sont administrés via trois injections transcutanées guidées par échographie directement dans le myocarde péri-infarci ; leur volume total varie entre 40 et 60 μ L par souris selon les groupes. Les souris traitées avec les Pg-iPS et CM-iPS reçoivent 1.4 millions de cellules et celles traitées avec les VE de Pg-iPS reçoivent les VE dérivées de 1.4 millions de Pg-iPS. Les VE ont directement été injectées chez les souris après ultracentrifugation ou congelées puis injectées.

b) Evaluation de l'effet thérapeutique

Après 7 semaines de traitement, les paramètres cardiaques sont de nouveau mesurés par échocardiographie par le même cardiologue en aveugle des groupes de traitement (Hany Nemetalla). Les souris sont sacrifiées et leur cœur est prélevé : la moitié est congelée en O.C.T. pour des analyses histologiques et l'autre moitié en cryotubes pour des analyses transcriptomiques. Les cœurs ont été répartis dans les deux groupes d'analyse de manière à ce que les paramètres cardiaques pré-greffes soient homogènes entre les groupes de traitement.

Analyse macroscopique :

L'effet thérapeutique des différents traitements est évalué par analyse macroscopique sur les cœurs prélevés dédiés aux analyses transcriptomiques (voir ci-dessous). Les cœurs sont nettoyés au PBS chauffé, puis radialement disséqués de façon à mettre à plat toute leur surface. Des photographies de chaque cœur ont été prises et le pourcentage de la zone infarctée par rapport à la surface totale du cœur a été déterminé par analyse informatique à l'aide du logiciel physioD3D. Les cœurs sont ensuite congelés rapidement en azote liquide en vue des analyses

transcriptomiques. La taille de l'infarctus a été calculée en prenant l'aire de la partie fibrotique (partie blanchâtre) par rapport à l'aire totale du cœur aplati, normalisée grâce à une règle.

Analyses histologiques et immuno-histochimiques :

Après avoir enlevé les oreillettes, les cœurs sont sectionnés transversalement et l'apex et la base sont enrobés séparément dans de l'O.C.T, congelés doucement en azote liquide et stockés à -80°C. Des coupes d'une épaisseur de 8 µm sont effectuées au cryostat (CM 1850, Leica) de façon à sectionner l'ensemble des deux parties du cœur : 30 lames sur 8 niveaux sont réalisées pour l'apex et la base. Les lames sont analysées par coloration hématoxyline-éosine (Mayer, Fluka) afin de déterminer la taille de l'infarctus. Des immuno-marquages à la lectine (Isolectine B4-FITC, Grifonia Simplicifolia, 50 µg/mL, CliniScience) et à l'isolectine combinée à l'agglutinine de germe de blé marqué au Texas Red (WGA – Wheat Germ Agglutinin, FL-1021-5, CliniScience) permettent d'évaluer la taille des CM et le nombre de vaisseaux par CM. Un marquage à l'actine α du muscle lisse (anti-SMA, A5228, dilution au 1/400^e, Sigma Aldrich) permet de quantifier la densité des artérioles en zone péri-infarctie (détails des colorations et marquages en Annexe 1). Les systèmes d'évaluation des lames sont les mêmes que ceux utilisés dans la première étude (voir p.94).

Analyses transcriptomiques :

Dans le but d'identifier les voies de signalisation activées par les cellules et VE injectées, l'ARN total des cœurs congelés en cryotubes est extrait par phénol/chloroforme comme décrit précédemment (voir p. 94). Les analyses transcriptomiques sont réalisées sur puce Affymetrix (Affymetrix GeneChip® Mouse Transcriptome Array 1.0, Affymetrix) et les données brutes sont importées dans le logiciel R/Bioconductor qui permet de traiter et d'analyser les données de séquençage. Les niveaux d'expression de gènes sont normalisés en utilisant des algorithmes personnalisés. Le bruit de fond est déterminé en supposant qu'un maximum de 80% des gènes est exprimé sur la puce et que les 20% des sondes restantes avec l'intensité la plus faible représentent le bruit de fond. Un seuil est fixé à deux écart-types par rapport à la moyenne du bruit de fond. Toutes les sondes pour lesquelles les intensités normalisées sont inférieures au seuil calculé sont désignées comme du bruit de fond.

Quand les niveaux d'expression d'un gène donné sont comparés entre deux groupes, une sonde est incluse dans l'analyse si son intensité excède le bruit de fond dans au moins 80% des animaux d'un groupe. Pour identifier les gènes différentiellement exprimés, la différence absolue de la moyenne de l'intensité de la sonde est utilisée. Toutes les sondes désignées comme du bruit de fond dans les différents groupes sont sélectionnées, la différence absolue des intensités entre les groupes est calculée et l'écart type de la distribution de ces différences est déterminé. L'expression différentielle d'un gène est considérée comme significative lorsque la moyenne de l'intensité dépasse un seuil fixé à la moyenne plus trois écart-types. Les comparaisons intergroupes sont réalisées à l'aide d'un test de Student et les listes sont filtrées à $p \leq 0,05$. Les analyses fonctionnelles des gènes sont réalisées à l'aide du logiciel Ingenuity (Ingenuity Pathway Analysis, IPA). Les analyses fonctionnelles des listes de gènes sont ensuite interprétées grâce au logiciel Ingenuity Pathway.

L'analyse de la puce a été réalisée par le Plateforme Génomique de l'Institut Cochin (INSERM U1016 – CNRS UMR8104 – Université Paris Descartes, Paris, France). Les données ont ensuite été analysées par la Plateforme Bio-informatique de l'Institut Imagine à l'Hôpital Necker – Enfants Malades (Paris Descartes, US 024 SFR Necker) par Nisa Renault, post-doctorante au laboratoire, et Nicolas Cagnard, ingénieur d'étude de la plateforme. Les données obtenues ont été soumises et validées par ArrayExpress (numéro d'accès E-MTAB-5164).

5. Analyse des miARN

Uniquement les miARN isolés des Pg-iPS et de leurs VE ont été analysés. Les miARN ont été extraits à l'aide du kit mirVana (AM1560, ThermoFisher Scientific) comme expliqué dans la première étude (voir p.98). Le pourcentage de miARN et leur intégrité ont été évalués par bioanalyseur. Le contenu en miARN des Pg-iPS et de leurs VE a été analysé à l'aide d'une puce miR 4.0 Affymetrix (Santa Clara, Californie, USA) sur trois préparations différentes de cellules et leurs VE correspondantes (réplicats biologiques). Les données sont normalisées de la même façon que les analyses transcriptomiques sur les cœurs de souris (voir p.94). Après avoir enlevé les sondes contrôles, la fréquence et l'identité des miARN présents dans les Pg-iPS et leurs VE sont déterminées et comparées à différents seuils d'intensité choisis arbitrairement sur la puce, ce qui permet de générer des diagrammes de Venn. Pour déterminer les miARN potentiellement

importants qui pourraient être impliqués dans les effets bénéfiques observés, les miARN présentant une intensité moyenne supérieure à 2^9 (log threshold 9) et ceux étant conservés à travers les espèces (TargetScanHuman, release 7.1, targetscan.org) sont sélectionnés. Les analyses ont été soumises et validées par ArrayExpress (numéro d'accès E-MTAB-5165). Ces analyses ont été réalisées par Nisa Renault et Nicolas Cagnard.

6. Analyse statistique

Les données sont analysées en aveugle des groupes de traitement par Marie-Cécile Périer. Elles sont exprimées en moyenne ou médiane pour les variables continues et en effectif (%) pour les variables catégoriques. Les valeurs fonctionnelles échographiques sont comparées en utilisant des tests d'analyse de variance (ANOVA) avec ajustement de Tukey pour les comparaisons multiples 2 à 2 et avec ajustement de Dunnett pour les comparaisons multiples avec un groupe contrôle. Pour comparer l'évolution intra-groupe de la fonction cardiaque avant et après traitement, des tests paramétriques de Student appariés sont utilisés. Les données histologiques ont été comparées en utilisant un modèle mixte d'analyse de variance et de covariance en prenant en compte la corrélation intracardiaque. Pour toutes les analyses, le seuil de significativité des tests bilatéraux est fixé à 5%. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne +/- erreur type (SEM) à l'exception des tests de prolifération cellulaire et de transdifférenciation où les données sont exprimées en médiane et en intervalle interquartile (q1 ; q3). Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1. Caractérisation des Pg-iPS et CM-iPS

Les Pg-iPS ont été cultivés pendant 4 jours et les CM-iPS pendant 7 jours dans leur milieu de culture respectif (Figure 42). Les Pg-iPS ont formé une monocouche de cellules confluentes alors que les CM-iPS se sont organisés différemment et semblent plus unis entre eux. A la fin de leur culture, ces derniers battent de manière synergique et régulière.

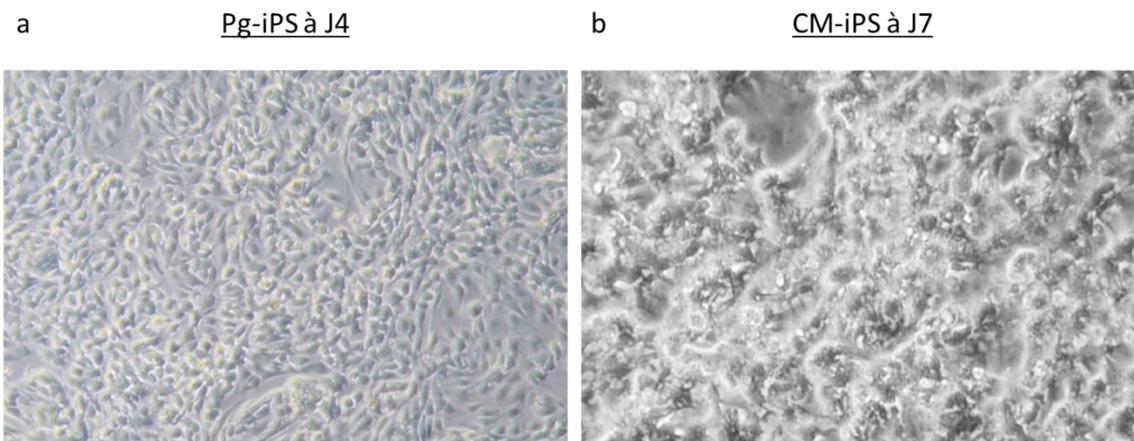


Figure 42 : Photographies des Pg-iPS (a) à 10X et des CM-iPS (b) à 20X respectivement à leur 4^{ème} et 7^{ème} jour de culture.

La viabilité des Pg-iPS en fin de culture était de 93.3% en moyenne (pour les deux cultures) et celle des CM-iPS de 91.3% en moyenne. En fin d'injections, elle est passée à 85.0% pour les Pg-iPS et à 89.4% pour les CM-iPS. Cela démontre la bonne viabilité des cellules injectées aux souris en ICC.

Après quatre jours de culture, le phénotype des cellules a été confirmé par immuno-histochimie (Figure 43). Les Pg-iPS expriment les marqueurs cardiovasculaires précoces tels que MEF2C, NKX2.5 et ISL1 et les CM-iPS expriment les marqueurs de CM matures tels que MYH7, ACTN2 et TNNI3.

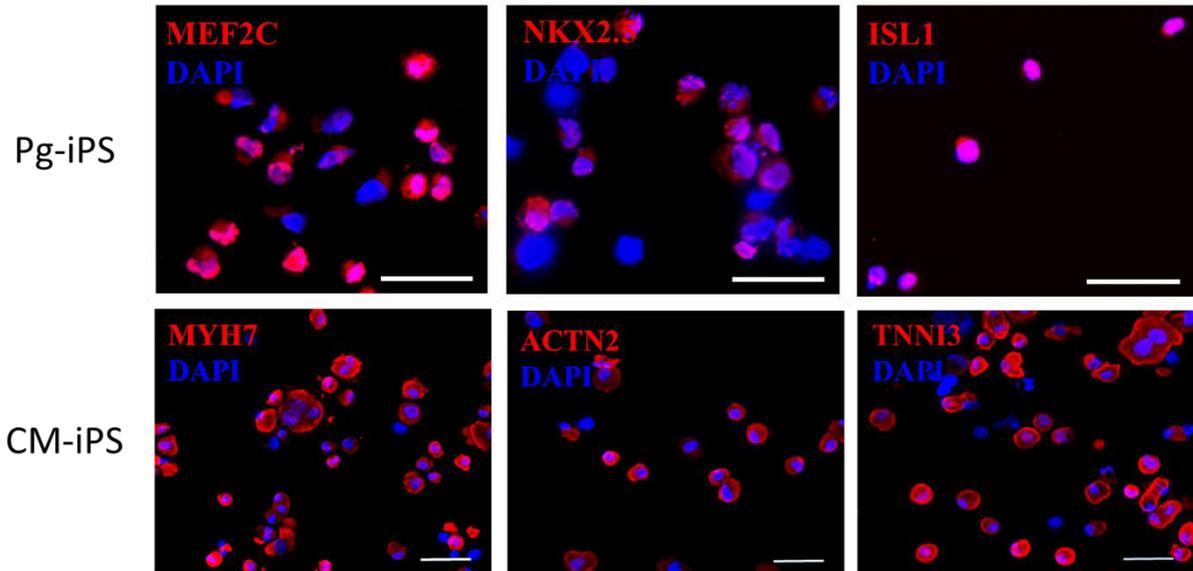


Figure 43 : Analyses immuno-histochimiques des Pg-iPS et des CM-iPS en fin de culture. Echelle : 50 μ m.

Ces données ont été confirmées par qPCR (Figure 44). Le profil d'expression de ces cellules a été comparé à celui de CS pluripotentes de type iPS. Les Pg-iPS et les CM-iPS ont perdu les marqueurs de pluripotence tels que NANOG, SOX2, OCT3/4 et LIN28 (à l'exception d'une faible expression de LIN28 pour les Pg-iPS). En revanche, ces cellules expriment les marqueurs cardiovasculaires précoces tels que MEF2C, ISL1, GATA4 et NKX2.5. Le stade de maturation avancé des CM-iPS est confirmé par l'expression des marqueurs cardiaques TBX20, TNNT2, PLN, MYL2, MYH6 et MYH7 alors que les Pg-iPS ne les expriment pas.

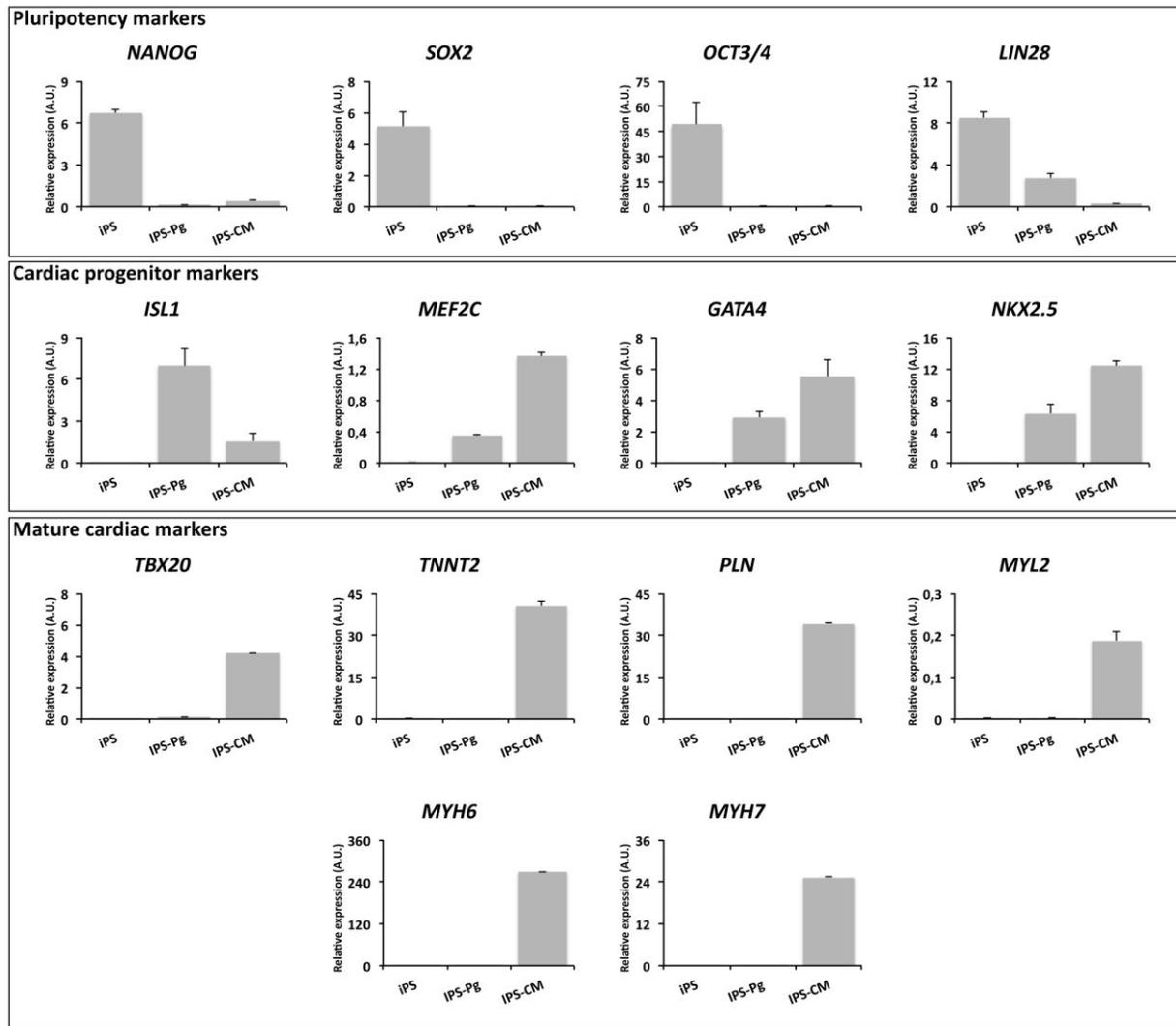


Figure 44 : Caractérisation des Pg-iPS et des CM-iPS par qPCR en fin de culture comparée à des CS pluripotentes iPS.

2. Caractérisation des vésicules extracellulaires *in vitro*

Dans la mesure où les CM sécrètent une très faible quantité de VE, leurs VE n'ont pas été caractérisées *in vitro*. Dans cette étude, toutes les données sur les VE obtenues sont celles dérivées de Pg-iPS et représentent les VE totales (exosomes, MP, corps apoptotiques).

Tout d'abord, le milieu de culture vierge (William's E + cocktail B + bFGF + gentamycine) a été analysé par NanoSight afin de s'assurer qu'il ne contient pas ou peu de particules qui pourraient biaiser la caractérisation des VE dérivées des cellules. L'analyse a montré très peu

de particules présentes dans ce milieu, considérées alors comme négligeables pour l'analyse des VE dérivées de Pg-iPS.

La distribution de taille des VE est très reproductible pour les différentes cultures de Pg-iPS et préparations de VE. Ici, trois spectres obtenus par analyse au NanoSight sont représentés et montre cette reproductibilité (Figure 45). Ce type cellulaire sécrète principalement des particules de la taille des exosomes puisque 59% des particules sont comprises entre 0 et 150 nm (Tableau 12). Le rendement moyen est de 17 347 particules libérées par Pg-iPS. Il n'est pas possible de comparer la quantité de VE sécrétées par les Pg-iPS et les autres types cellulaires étudiés précédemment puisque les réglages de l'acquisition et du traitement des données au NanoSight ont été modifiés par rapport aux études précédentes. Ces changements ont été réalisés car ils permettent d'analyser plus correctement les particules de petite taille, ce qui est plus adapté pour nos échantillons.

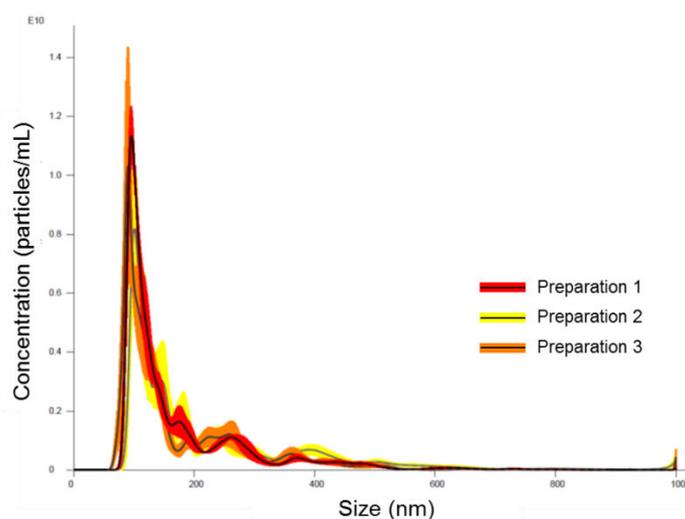


Figure 45 : Spectres de la distribution de taille de trois cultures et préparations différentes de VE dérivées de Pg-iPS analysés par NanoSight.

Préparation	Concentration totale (particules/ μ L)	Rendement (particules/cellule)	Taille des particules au pic de concentration (nm)	% particules 50-150 nm	% particules 151-500 nm	% particules 501-1000 nm
1	6,20E+08	16 702	97,2	63,4%	34,1%	2,2%
2	5,90E+08	18 961	101	48,7%	44,0%	6,3%
3	6,00E+08	16 378	97,4	64,2%	33,8%	1,6%

Tableau 12 : Caractéristiques des VE dérivées de Pg-iPS obtenues par analyse au NanoSight.

L'analyse par cryo-MET a permis de visualiser des particules principalement de la taille des exosomes (Figure 46a), et quelques particules de la taille des MP (Figure 46b) et des corps apoptotiques (Figure 46c). Ces observations sont en accord avec l'analyse par NanoSight (particules de petite taille plus abondantes).

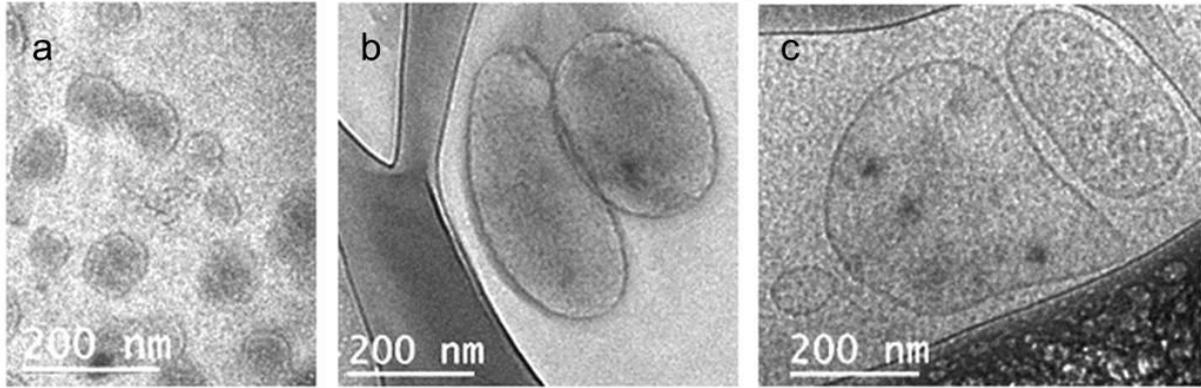


Figure 46 : Visualisation des VE dérivées de Pg-iPS par cryo-MET

3. Evaluation de l'efficacité des vésicules extracellulaire *in vitro*

a) Effet sur la viabilité cellulaire

La privation de sérum pendant 27 heures des cellules H9c2 entraîne une chute drastique du nombre de cellules viables (contrôle négatif) (Figure 47). Les VE de SVF à une concentration de 5×10^9 entraînent une légère augmentation de la viabilité cellulaire. Cette condition représente un contrôle interne pour ce test, en plus des contrôles positif et négatif. Lorsque les VE dérivées de Pg-iPS à J4 sont ajoutées sur les cellules stressées, la viabilité cellulaire augmente selon un mécanisme dose-dépendant, dépassant même l'effet du contrôle positif aux doses de 13.2×10^9 et 53×10^9 VE. Les VE incubées à une dose de 53×10^9 représentent la condition ayant donné la meilleure réponse (soit 2.3 fois plus que le contrôle négatif), bien que cette condition n'ait été testée qu'une seule fois. Passée cette dose, il semblerait que l'efficacité des VE soit moins bénéfique malgré une forte dose incubée. A partir de la dose à 5.3×10^9 de VE incubées, les résultats sont significatifs (représentant 21 200 VE par cellule cibleensemencée). Elle représente donc la condition utilisée en tant que contrôle-qualité des préparations de VE.

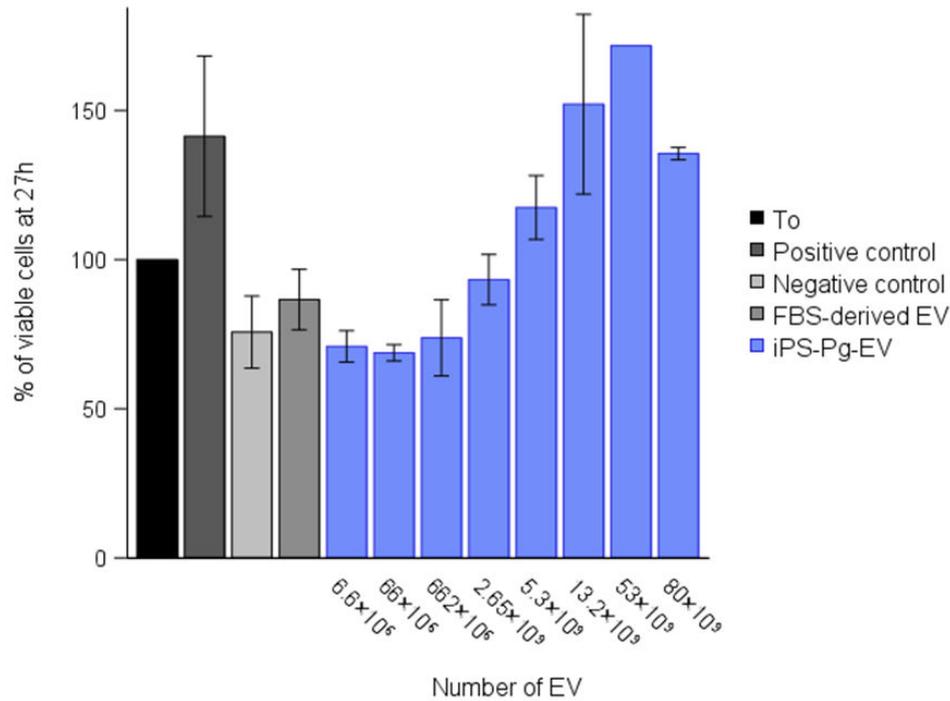


Figure 47 : Etude de l'effet des VE sur la viabilité cellulaire.

Le milieu de culture vierge comporte une très forte dose de bFGF (1 µg/mL) qui pourrait être entraîné avec les VE lors de l'ultracentrifugation. Le bFGF est une protéine connue pour avoir des effets positifs dans de nombreuses voies de signalisation. Dans le but d'analyser l'effet contaminant du bFGF dans ce test de viabilité, du milieu de culture seul a été incubé pendant 48 heures à 37°C et 7% de CO₂ dans des flasques coâtées à la fibronectine (reproduction des conditions de culture des Pg-iPS). Le milieu a ensuite été ultracentrifugé dans les mêmes conditions et le fond du tube a été rincé dans le même volume que celui des VE de Pg-iPS. Différents volumes du rinçage équivalent à ceux des VE incubées ont ensuite été testés et aucun effet positif n'a été observé sur la viabilité.

b) Effet sur l'angiogenèse

Test de cicatrisation :

Après formation de la cicatrice dans la monocouche de cellules endothéliales, des images ont été prises toutes les 6 heures pendant 24 heures. A partir de 18 heures, les différentes conditions montrent des résultats clairs et consistants. Le contrôle positif (milieu complet) montre une repopulation moyenne de la cicatrice de 97% (Figure 48b) tandis que le contrôle négatif (milieu

pauvre) de seulement 10% (Figure 48c). Les VE de Pg-iPS à J4 permettent de repeupler la cicatrice de façon dose-dépendante (Figure 48a et d). Même la dose la plus faible de VE a un effet positif léger (1.0×10^7 représentant 667 VE par cellule cible). La dose la plus élevée (1.0×10^{10} soit 666 667 VE par cellule cible) permet de refermer la cicatrice à 80%. Cette dernière condition n'a été testée qu'une seule fois puisqu'elle utilise un nombre très important de VE mais est cohérente avec les autres résultats obtenus. On peut penser qu'avec une dose encore plus élevée, cet effet positif serait encore plus marqué et atteindrait l'efficacité du contrôle positif. La dose à 1.0×10^9 de VE incubées est celle à partir de laquelle les résultats sont significativement différents.

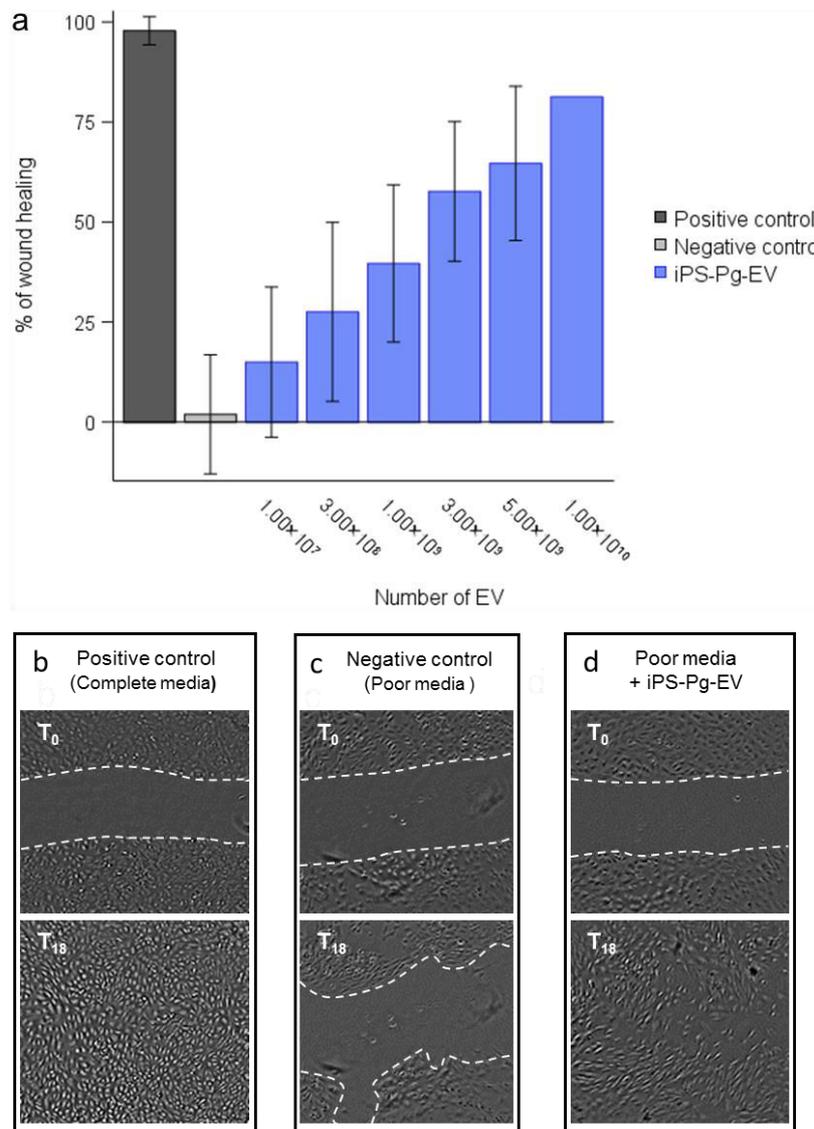


Figure 48 : Etude de l'effet des VE sur l'angiogenèse grâce à un test de cicatrisation.

Evaluation de la formation de tubes :

L'effet angiogénique des VE à J4 a également été déterminé par l'évaluation de la formation de tubes. Le milieu pauvre ne permet pas la formation de tubes de cellules endothéliales (Figure 49d). Cependant, lorsqu'il est supplémenté de VE à différentes doses, des tubes apparaissent sur la matrice de Matrigel après 24 heures d'incubation (Figure 49e). L'efficacité de formation de tubes est analysée en mesurant la longueur des tubes formés et le nombre de connexions entre eux. La dose à 1.0×10^9 de VE incubées est celle qui s'est montrée la plus efficace avec une longueur de 750 pixels et 27 connexions. Bien que chaque dose de VE testée ait un effet positif sur la formation de tubes endothéliaux, les VE n'agissent pas selon un mécanisme dose-dépendant, comme il a été observé dans les tests de viabilité et de cicatrisation (Figure 49a et b). Afin d'évaluer la capacité angiogénique des VE, le test de cicatrisation est préféré à celui-ci pour sa reproductibilité.

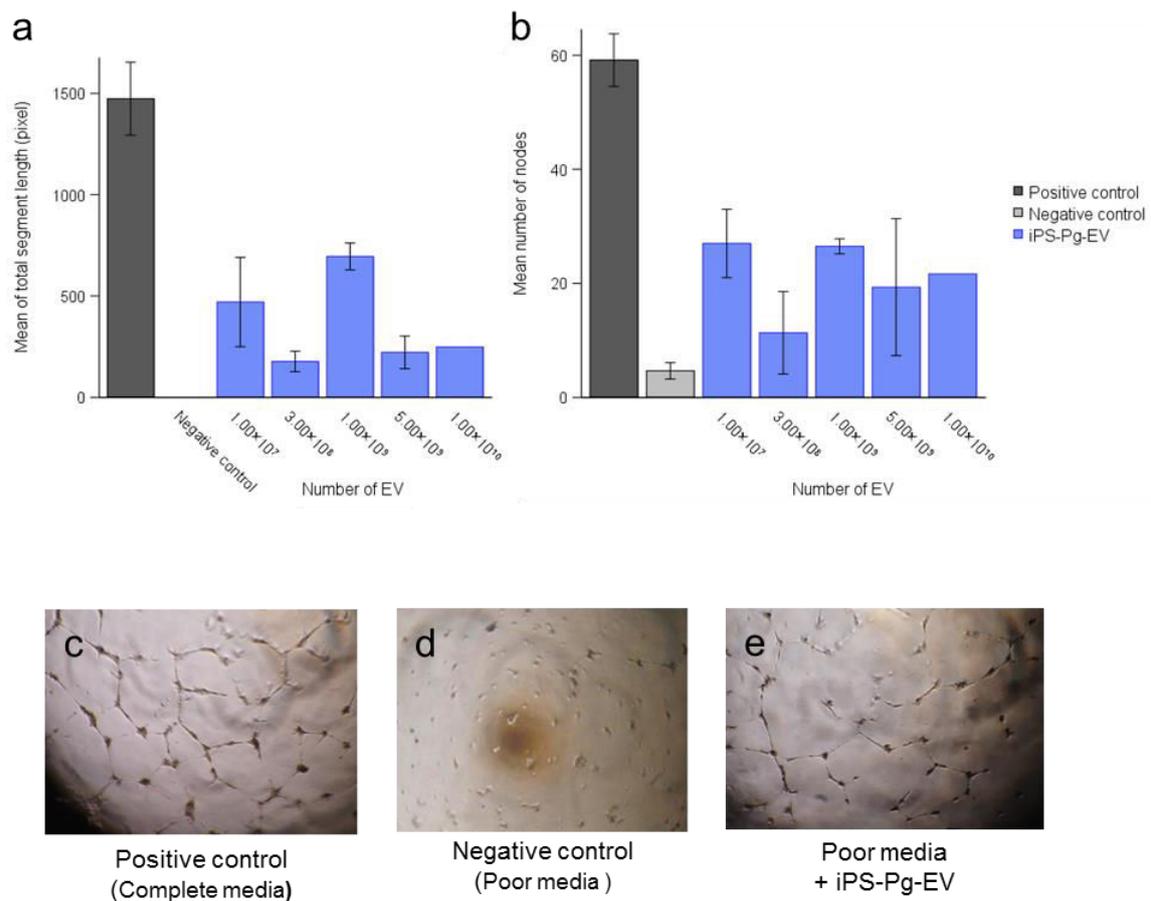


Figure 49 : Etude de l'effet des VE sur l'angiogenèse grâce à un test de formation de tubes de cellules endothéliales.

c) Effet sur la prolifération cellulaire

Ces résultats ont été obtenus avec trois préparations de VE différentes isolées à partir du MC à J2 de culture. Le niveau de base de prolifération des CM dérivés de CSEh est d'environ de 15%. Lorsque les VE sont ajoutées à dose croissante, le niveau de prolifération augmente atteignant 35% (soit 2.3 fois plus que le contrôle) avec une dose de 1.81×10^9 VE représentant 181 000 VE par cellule cibleensemencée (Figure 50). Au-delà de cette dose, l'effet bénéfique des VE décroît légèrement. A partir de la dose à 6.03×10^8 VE, les résultats sont significatifs.

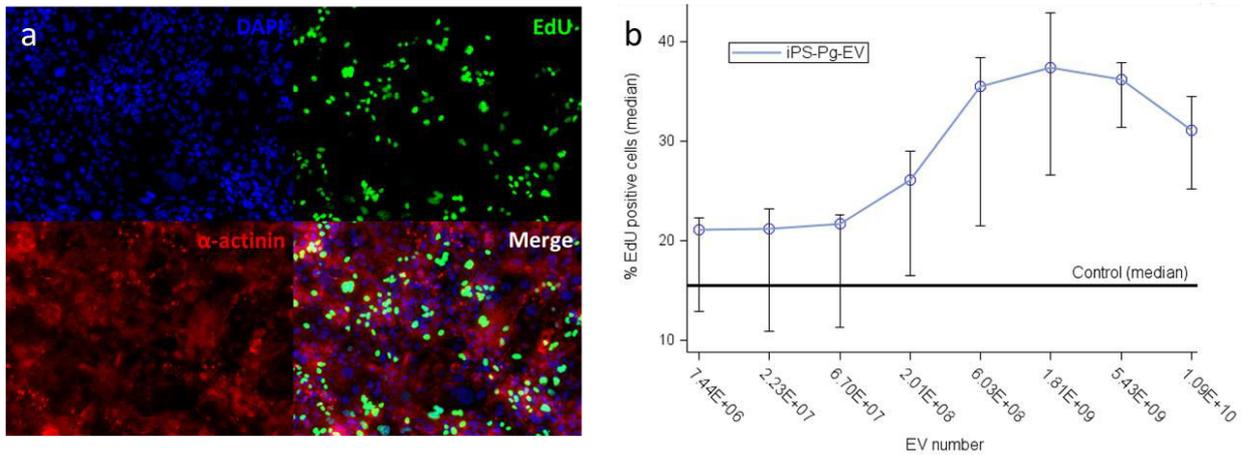


Figure 50 : Etude de l'effet sur la prolifération de CM-CSEh grâce à une réaction EdU. a) Exemple des différents marquages. b) Graphique montrant l'effet sur la prolifération des CM-CSEh en fonction de la dose de VE incubée.

L'effet des VE à J2 et J4 de culture a été comparé dans ce test. Les VE à J4 améliorent la prolifération des CM avec le même mécanisme dose-dépendant. Toutefois, il semblerait que les VE à J4 ont un effet légèrement supérieur à celui observé à J2 (Figure 51). Chaque courbe représente une préparation de VE.

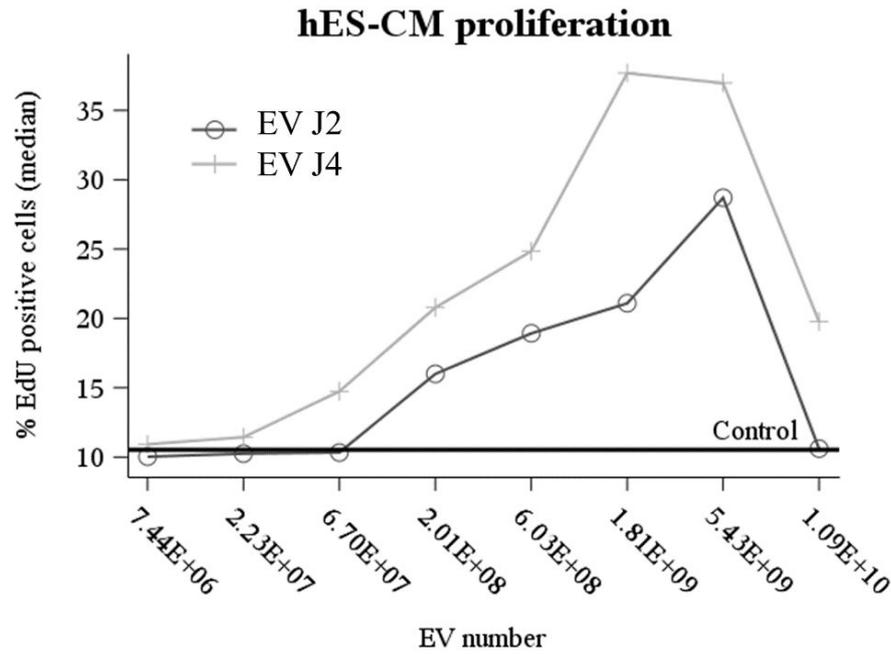


Figure 51 : Eude de l'effet des VE à J2 et à J4 sur la prolifération de CM-CSEh.

Dans le but d'étudier la stabilité et la conservation des VE, des VE issues d'une même préparation ont été séparées en deux parties après ultracentrifugation et resuspension : l'une a été conservée à 4°C sur la nuit puis congelée, l'autre a directement été congelée. Les deux méthodes de conservation montrent des résultats fonctionnels similaires en augmentant la prolifération de CM en fonction de la dose de VE incubées. Les VE conservées à 4°C (du moins sur une courte période) sont stables et leur efficacité n'est pas altérée (Figure 52).

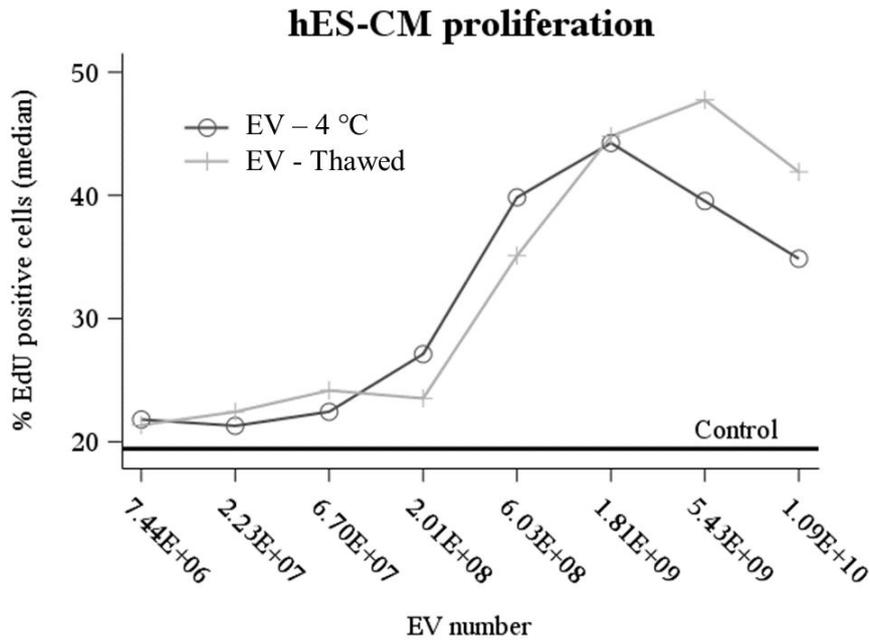


Figure 52 : Etude de l'effet des VE « fraîches » et congelées sur la prolifération de CM-CSEh.

d) Effet sur la transdifférenciation

Lors de l'ajout de la doxycycline, un antibiotique, les fibroblastes murins expriment les trois facteurs de transcription, Mef2c, Gata4, Tbx5, impliqués dans leur transdifférenciation en CM. Le niveau de base de transdifférenciation est d'environ 20% et n'est pas augmenté lors de l'ajout, à différentes doses, des VE (Figure 53). Bien que les VE de Pg-iPS aient démontré leur capacité thérapeutique sur la viabilité cellulaire, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire, elles ne semblent pas agir via un mécanisme de transdifférenciation.

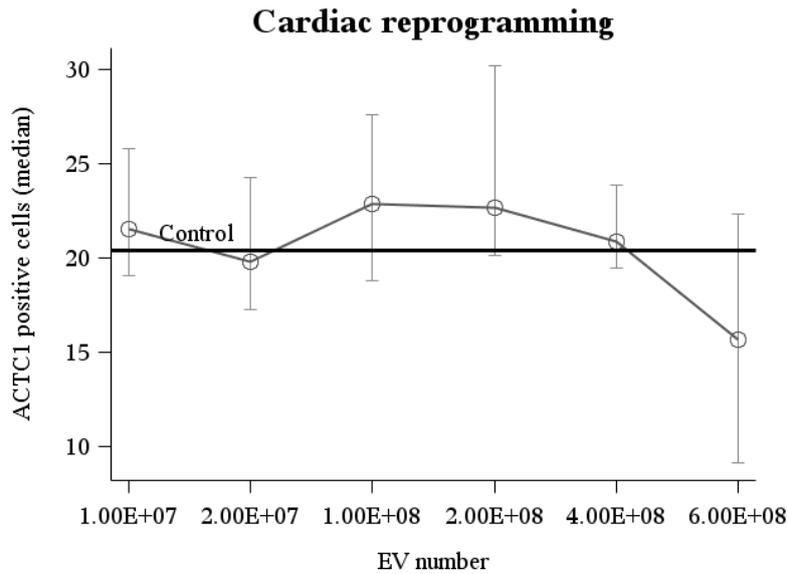


Figure 53 : Etude de l'effet des VE sur la transdifférenciation de fibroblastes en CM.

e) Internalisation des vésicules extracellulaires

Les VE ont été marquées à la calcéine-AM afin de visualiser leur internalisation dans leurs cellules cibles. Le marquage des VE a été confirmé par ImageStream qui montre que la grande majorité des VE sont fluorescentes (Figure 54a). L'analyse individuelle des VE marquées montre que l'intensité de fluorescence est différente d'une particule à une autre et que les particules de petite taille (< 300 nm telles que les exosomes) ne sont pas visibles en lumière blanche mais uniquement dans le canal fluorescent 02 comme le suggère la deuxième particule analysée sur la Figure 54b. Les cellules H9c2 sont ensuite incubées dans les différentes conditions, analysées par ImageStream après sélection de la population d'intérêt et mise au point du microscope, et les histogrammes d'intensité de fluorescence de chaque condition sont superposés (Figure 54c-e). Les conditions négatives (1 : milieu complet, 2 : milieu pauvre, 3 : milieu pauvre + VE de SVF non marquées, 5 : milieu pauvre + VE de Pg-iPS non marquées, 6 : milieu pauvre + rinçage PBS) sont validées par une absence de fluorescence. A l'inverse, les cellules directement marquées par la calcéine-AM (conditions 7 et 8) expriment une très forte intensité de fluorescence, bien que l'intensité du laser ait dû être diminuée. De la même manière, les cellules incubées avec les VE de Pg-iPS marquées (condition 4) montrent une augmentation de leur fluorescence ce qui suggère que les VE ont été internalisées ou captées à leur surface. L'aspect des cellules individualisées dans les différentes conditions testées confirme les intensités de fluorescence observées précédemment (Figure 54f).

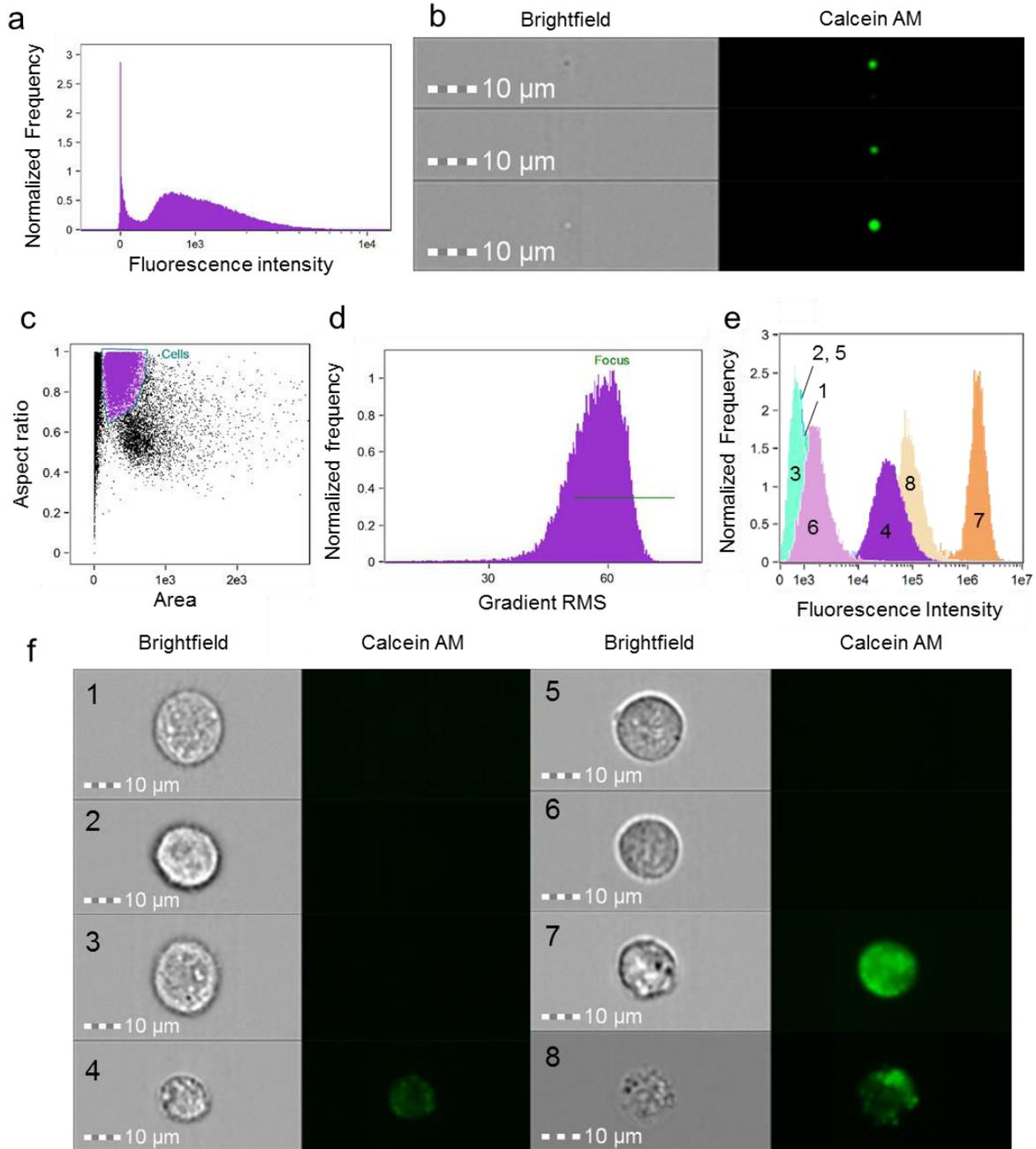


Figure 54 : Internalisation des VE de Pg-iPS marquées à la calcéine-AM par les cellules H9c2.

L'internalisation des VE par les cellules H9c2 a ensuite été confirmée par microscopie confocale (Figure 55a). En effet, les VE sont visualisées dans le cytoplasme des cellules et non à leur surface. Des VE de Pg-iPS non marquées (Figure 55b) et le PBS ayant servi au rinçage du marquage (possible contamination des cellules avec de la calcéine-AM libre) (Figure 55c) ont aussi été incubés avec les cellules en tant que contrôles de marquage et aucune fluorescence

n'a été observée ce qui confirme que le marquage de la Figure 55a correspond bien à l'internalisation des VE.

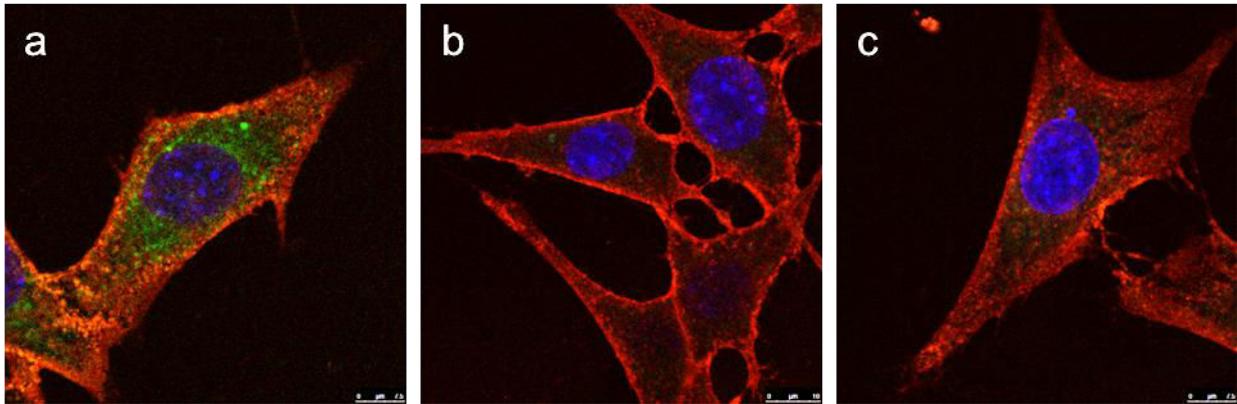


Figure 55 : Internalisation des VE de Pg-iPS par les cellules H9c2 par microscopie confocale (63X).

4. Etude de l'effet thérapeutique des vésicules extracellulaires *in vivo*

a) Analyse de la fonction cardiaque chez les souris ICC

Un IDM a été réalisé chez 199 souris immunodéficientes âgées de 9 à 10 semaines par ligature permanente de l'artère coronaire antérieure gauche. Environ trois semaines plus tard, les paramètres cardiaques ont été mesurés par échocardiographie chez 112 souris et 91 d'entre elles ont été incluses dans l'étude. Quatre souris sont décédées entre l'échocardiographie et les injections. Au total, 20 ont reçu du PBS (souris contrôles), 24 ont reçu 1.4 millions de CM-iPS, 21 ont reçu 1.4 millions de Pg-iPS et 22 ont reçu les VE totales dérivées de 1.4 millions de ces mêmes Pg-iPS (environ 3×10^{10} VE par souris). Les VE ont été directement injectées après ultracentrifugation (11 souris) ou ont été congelées puis injectées (11 souris). Dans cette étude, une seule souris est décédée pendant les injections intra-myocardiques. Après sept semaines de traitement, 17 ayant reçu le PBS et les Pg-iPS ainsi que 19 ayant reçu les CM-iPS et les VE de Pg-iPS ont de nouveau été échographiées pour comparer l'évolution après chaque traitement. Le cœur de ces souris a été prélevé pour analyse histologique (incluant 7 souris traitées avec du PBS, 8 avec les CM-iPS, 5 avec les Pg-iPS et 8 avec les VE) et transcriptomique (9 souris traitées avec du PBS, 10 avec les CM-iPS, 10 avec les Pg-iPS et 10 avec les VE) (Figure 56). En prenant en compte uniquement les souris incluses et ayant survécu jusqu'à la fin de l'étude,

aucune différence statistique n'a été observée entre les groupes avant l'administration du traitement ($p=0.55$, 0.56 et 0.56 avant traitement pour le VTS, le VTD et la FE, respectivement).

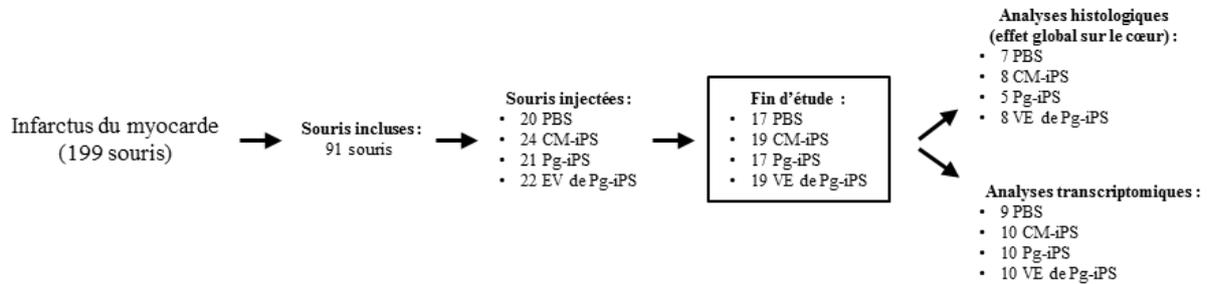


Figure 56 : Récapitulatif du nombre d'animaux à chaque étape de l'étude.

Après sept semaines de traitement, aucune différence significative intergroupe n'a été retrouvée. En revanche, les évolutions des paramètres cardiaques sont significativement différentes dans certains groupes. La meilleure amélioration de la fonction cardiaque est observée dans le groupe de souris traitées avec les VE avec une diminution significative du VTS de $5.75 \mu\text{L} \pm 0.77 \mu\text{L}$ (diminution de 11% par rapport à t_0) et du VTD de $3.25 \mu\text{L} \pm 0.84 \mu\text{L}$ (4%) et une augmentation significative de la FE de $4.85\% \pm 0.64\%$ (14%) (Figure 57). La comparaison de l'évolution des souris traitées avec les VE « fraîches » et les VE congelées ne montre pas de différence significative ($p=0.34$) ce qui suggère que l'efficacité des VE n'est pas altérée par un cycle de congélation/décongélation. Dans le groupe contrôle de souris, les paramètres cardiaques sont également améliorés significativement avec une diminution du VTS de $3.64 \mu\text{L} \pm 0.83 \mu\text{L}$, du VTD de $1.36 \mu\text{L} \pm 0.63 \mu\text{L}$ et une augmentation de la FE de $3.75\% \pm 0.81\%$. Le groupe de souris ayant reçu les CM-iPS montre une faible amélioration de la fonction cardiaque, mais moins significative que le groupe contrôle. Ces résultats sont en corrélation avec les résultats retrouvés dans la deuxième étude. De manière surprenante, l'administration de Pg-iPS n'améliore donc pas la fonction cardiaque des souris en ICC.

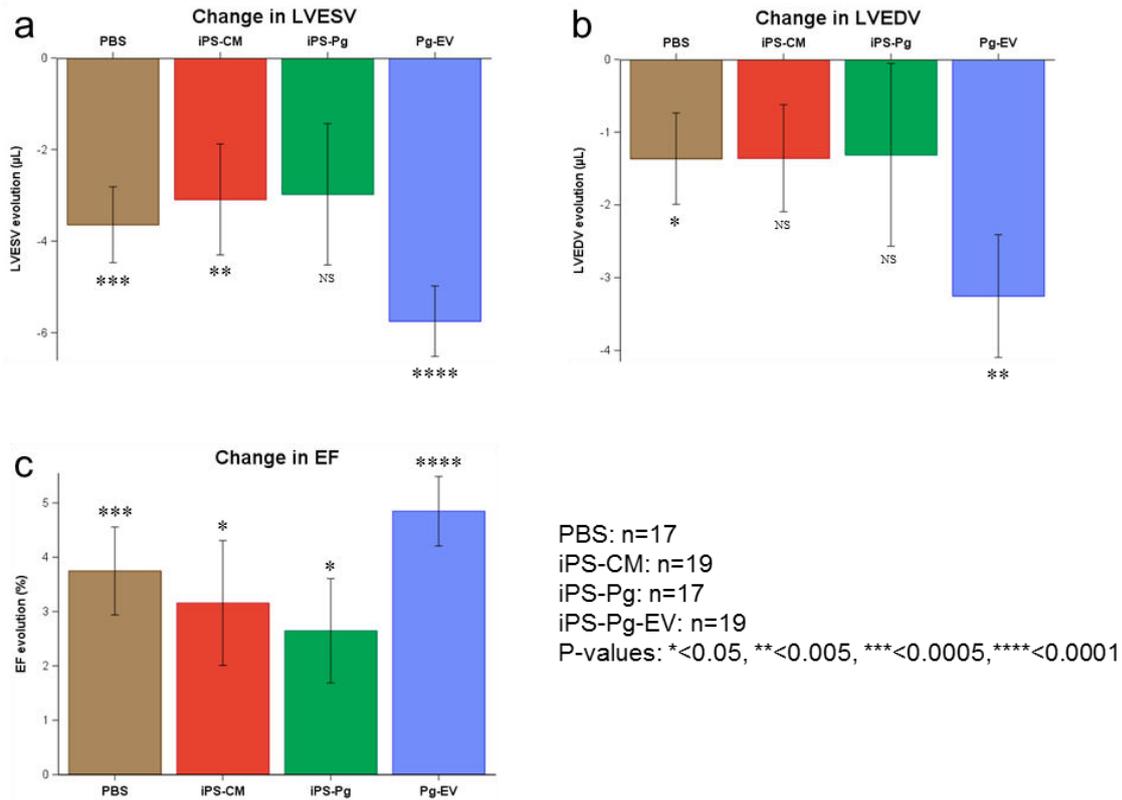


Figure 57 : Comparaison de l'évolution de la fonction cardiaque des souris traitées avec les CM-iPS, les Pg-iPS et les VE de Pg-iPS par rapport aux souris contrôles. a) Evolution du VTS en microlitres. b) Evolution du VTD en microlitres. c) Evolution de la FE en pourcentage. Les étiquettes à l'intérieur des barres des graphiques représentent l'évolution en pourcentage de t_0 . * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Afin de comprendre pourquoi les paramètres cardiaques des souris traitées avec les Pg-iPS ne se sont pas améliorés alors que les VE ont induit les meilleurs résultats fonctionnels, la représentation graphique de l'évolution du VTS, considéré comme un des paramètres les plus fiables de la fonction cardiaque, a été modifiée de façon à analyser l'évolution individuelle des souris (Figure 58). De manière intéressante, les améliorations des souris traitées avec les cellules CM-iPS et Pg-iPS sont plus variables comparées aux deux autres groupes. Un seuil est fixé à une amélioration de 5% et le nombre de souris au-dessus de ce seuil est compté pour chaque groupe. Le groupe des souris traitées avec les VE comporte significativement plus de souris qui ont répondu positivement au traitement, c'est-à-dire dont le VTS s'est amélioré de plus de 5% (16 souris sur 19) par rapport aux autres groupes ($p=0.04$, χ^2). De plus, une analyse de la variance a révélé que le groupe traité avec les CM-iPS est significativement plus hétérogène, en termes d'évolution du VTS, que le groupe traité avec les VE ($p=0.02$).

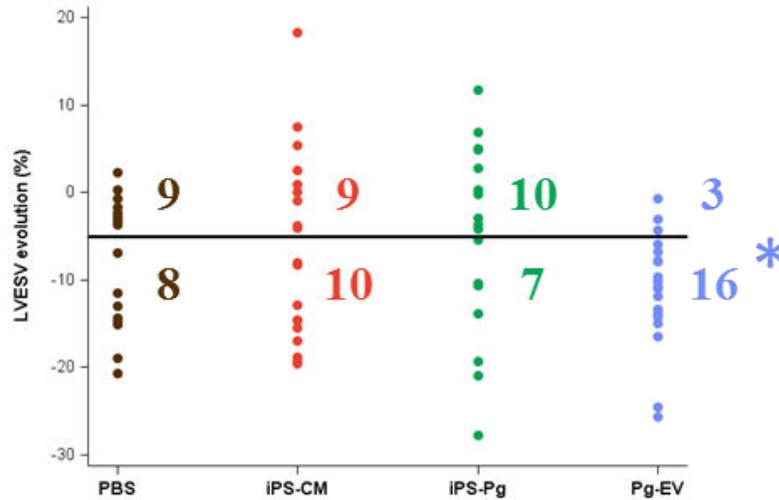


Figure 58 : Evolutions individuelles du VTS des souris traitées avec le PBS, les CM-iPS, les Pg-iPS et leurs VE.

b) Analyse macroscopique

L'étendue de l'infarctus a été déterminée macroscopiquement après avoir étalé à plat toute la surface du cœur. L'analyse n'a pas montré de différences significatives entre les différents groupes de traitement (Figure 59).

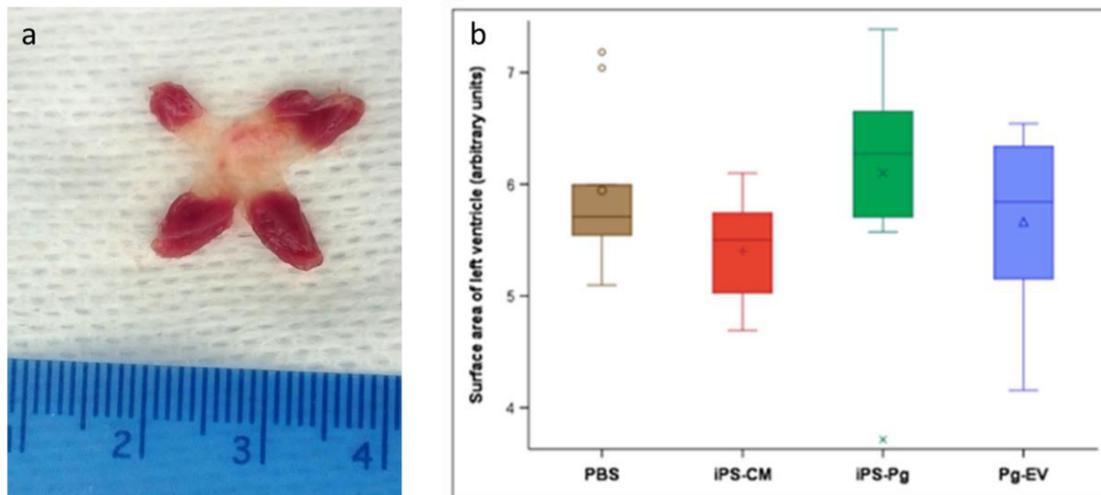


Figure 59 : a) Exemple de photographie d'un cœur étalé. b) Comparaison de l'étendue de l'infarctus entre les souris traitées avec le PBS, les CM-iPS, les Pg-iPS et leurs VE par analyse macroscopique.

c) Analyses histologiques et immuno-histochimiques

Des analyses histologiques et immuno-histochimiques ont été réalisées sur la moitié des cœurs congelés en O.C.T. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les groupes que ce

soit dans la taille de l'infarctus (Figure 60a), la densité des artéριοles (Figure 60b), le nombre de capillaire par CM (Figure 60c) ou la taille des CM (Figure 60d). Les résultats obtenus avec les deux méthodes utilisées pour évaluer la taille des infarctus diffèrent légèrement mais mènent à la même conclusion. Toutefois, les données obtenues avec l'analyse macroscopique ont montré des résultats plus homogènes par rapport à l'analyse par coloration. L'analyse de la fibrose globale n'a pas été réalisée dans cette étude puisque l'étendue de la fibrose et la taille de l'infarctus sont très corrélées (observé dans la première étude, voir p.112).

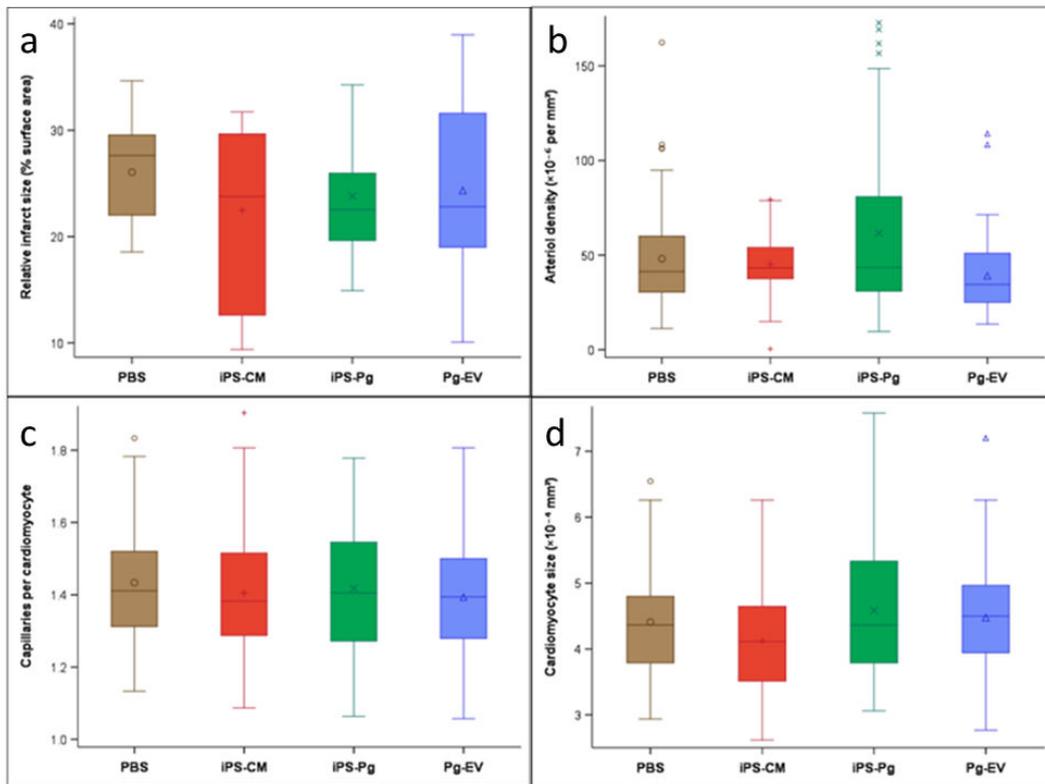


Figure 60 : Analyses histologiques et immuno-histochimiques des cœurs de souris traitées avec le PBS, les CM-iPS, les Pg-iPS et leurs VE.

d) Analyses transcriptomiques

Les ARN totaux extraits des cœurs de souris ont été analysés par puce Affymetrix. Les niveaux d'expression de gènes de chaque traitement ont été comparés à ceux des souris contrôles (PBS). Nous avons pris la liste des gènes différentiellement exprimés et observé les voies de signalisation associées à chaque traitement. L'analyse des profils d'expression de gènes a montré que chaque traitement entraîne une réponse différente dans le cœur des souris (Figure

61). Les animaux traités avec les VE ont plus de gènes en commun avec ceux recevant les Pg-iPS (573 gènes représentant 37% des gènes totaux différentiellement exprimés) qu'avec ceux traités avec les CM-iPS (257 gènes représentant 17% des gènes totaux). Cela peut s'expliquer par le fait que les VE dérivent directement des Pg-iPS et que ces deux traitements affectent donc l'expression de gènes communs. Seulement 10% des gènes totaux exprimés après traitement par les VE sont communs avec les deux autres traitements (158 gènes). Les traitements CM-iPS, Pg-iPS et VE induisent une réponse unique impliquant respectivement 350, 1090 et 882 gènes. L'administration de CM-iPS induit une plus faible réponse dans l'expression des gènes que les deux autres traitements. Cette observation pourrait expliquer les résultats neutres obtenus sur la fonction cardiaque des souris en ICC à la suite de l'injection des CM-iPS (études 2 et 3) et par extension des VE (étude 2).

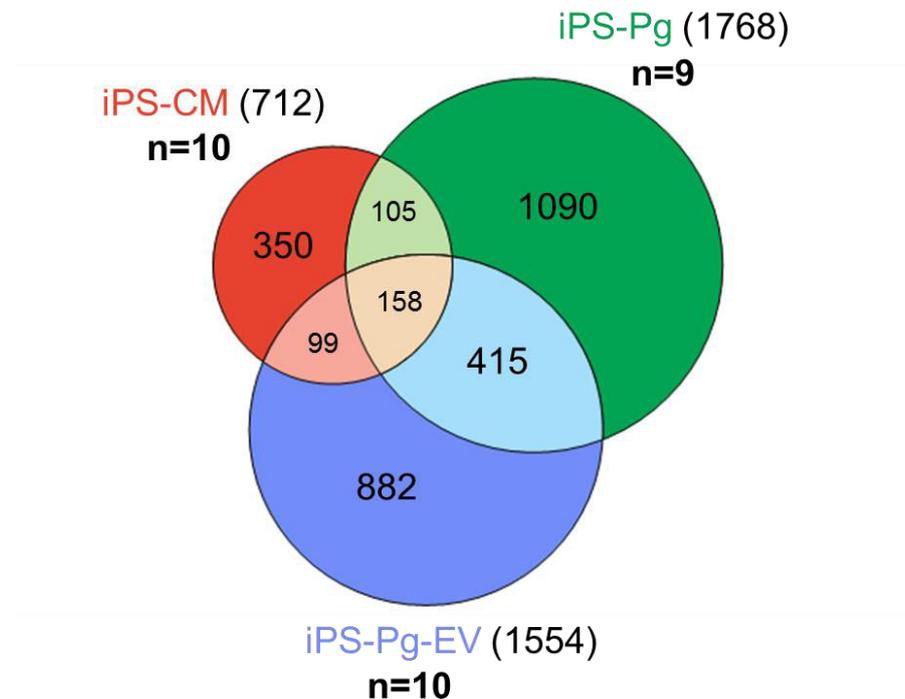


Figure 61 : Représentation graphique des gènes différentiellement exprimés dans les cœurs de souris en fonction des différents traitements, CM-iPS, Pg-iPS et VE de Pg-iPS comparé aux gènes exprimés dans le groupe contrôle PBS.

L'analyse fonctionnelle des listes de gènes grâce au logiciel Ingenuity Pathway a permis d'identifier les voies de signalisation associées à ces gènes pour chaque traitement (Figure 62). Chaque voie de signalisation est prédite pour être sous-exprimée (bleu) ou surexprimée (rouge) pour chaque traitement. Chaque colonne représente un traitement (dans l'ordre CM-iPS, Pg-

iPS et VE de Pg-iPS) et les voies de signalisation sont d'abord classées de façon à avoir les plus grandes différences d'enrichissement entre le groupe des VE et les autres groupes (ordre décroissant). L'analyse des gènes spécifiques associés au traitement par les VE (882 gènes) a montré que les voies de signalisation qu'ils contrôlent prédisent des effets cardio-protecteurs et bénéfiques incluant une stimulation de la prolifération, de la viabilité et de la survie cellulaires, de l'angiogenèse et de la cardiogenèse. Par ailleurs, l'identité de ces gènes permet de prédire une sous-expression des voies de signalisation néfastes pour la réparation cardiaque telles que l'apoptose et la nécrose. La liste a été tronquée après la 78^{ème} ligne.

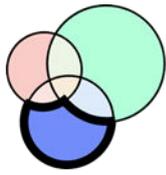


Figure 62 : Comparaison des niveaux d'enrichissement de fonctions biologiques entre les différents groupes de traitement. Pour chaque groupe, les gènes spécifiques à chaque groupe de traitement et différenciellement exprimés par rapport au PBS sont pris en compte.

Une deuxième analyse incluant l'ensemble des gènes différentiellement exprimés pour chaque groupe (1554 gènes au total) a été réalisée. Des résultats très similaires ont été retrouvés, avec en plus une sous-expression des voies associées à la mortalité et à la morbidité dans le groupe traité avec les VE (Figure 63). Cette liste a été tronquée après la 93^{ème} ligne.

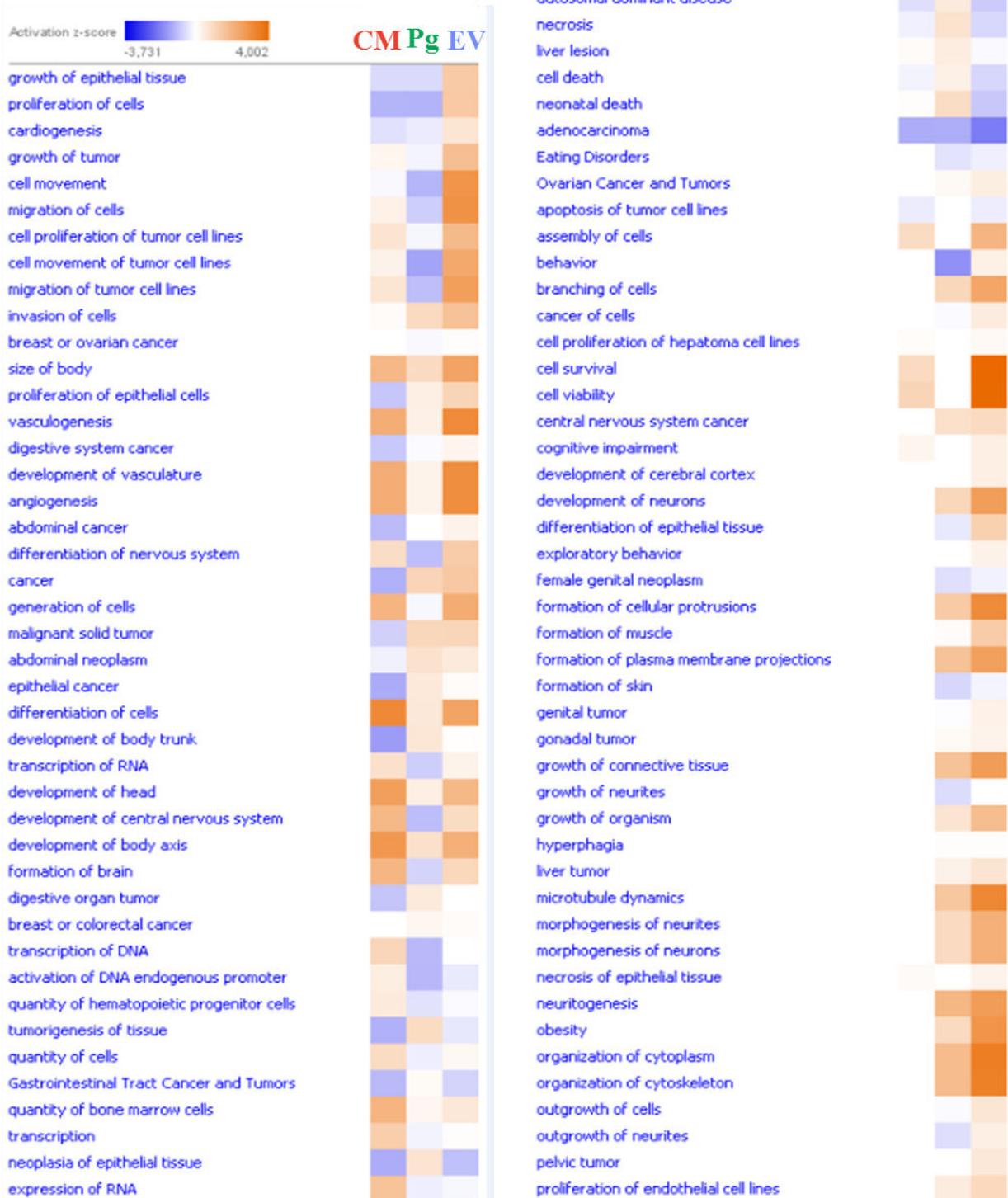
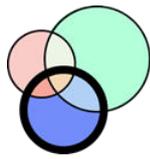


Figure 63 : Comparaison des niveaux d'enrichissement de fonctions biologiques entre les différents groupes de traitement. Pour chaque groupe, la totalité des gènes différenciellement exprimés par rapport au PBS est pris en compte.

5. Analyse du contenu en miARN des vésicules extracellulaires

L'analyse au bioanalyseur a permis de mettre en évidence l'enrichissement en miARN des VE par rapport à leurs cellules mères. En effet, en moyenne 53% des petits ARN totaux sont des miARN dans les VE contre 17% dans les Pg-iPS (Figure 64). Ces résultats sont reproductibles d'une culture et d'une préparation de VE à une autre.

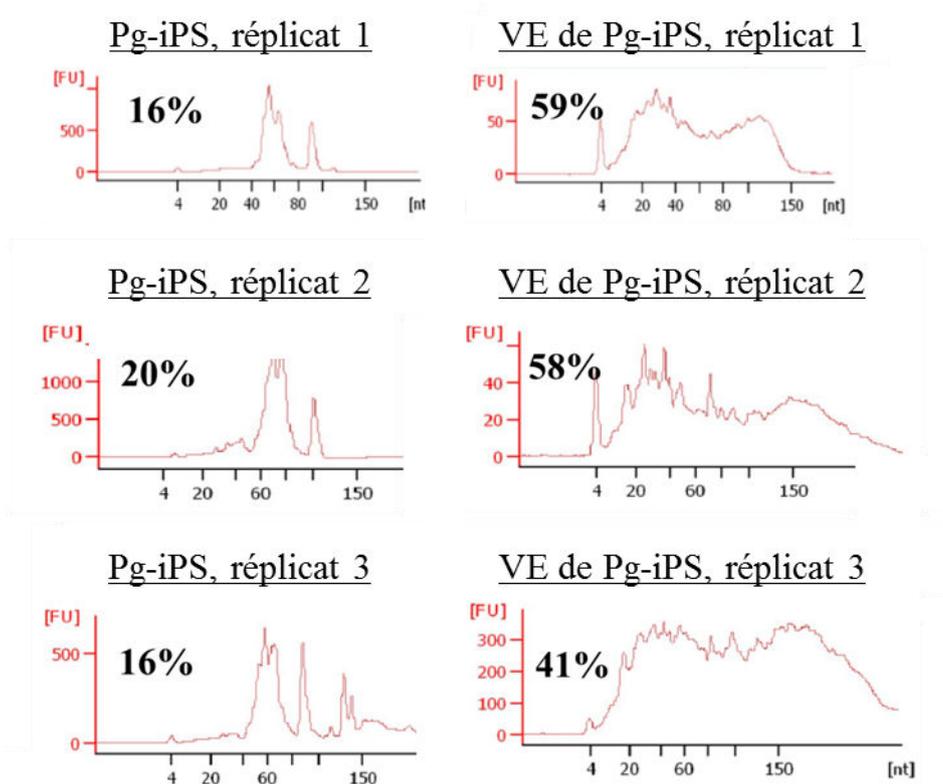


Figure 64 : Analyse par bioanalyseur du contenu en miARN contenu dans les Pg-iPS et les VE de Pg-iPS.

Les listes des miARN présents dans les Pg-iPS et dans leurs VE ont ensuite été comparées grâce à une analyse sur puce Affymetrix. Les miARN ont été triés en fonction de leur intensité sur la puce (intensité allant de 0 à 14 selon une échelle arbitraire) (Figure 65). La ligne verte représente le nombre de miARN uniquement présents dans les Pg-iPS, la bleue représente le nombre de miARN uniquement présents dans les VE et l'orange, le nombre de miARN présents à la fois dans les Pg-iPS et dans les VE. Des seuils d'intensité ont été choisis arbitrairement (6 et 9) et le nombre de miARN présents dans les Pg-iPS et dans les VE a été comparé pour chaque seuil choisi. Au seuil de détection à 6, les Pg-iPS contiennent plus de miARN que les VE : 92 miARN

sont retrouvés spécifiquement dans les Pg-iPS contre 53 dans les VE et 170 sont retrouvés à la fois dans les Pg-iPS et dans les VE. Au contraire, lorsqu'on augmente l'intensité sur la puce (seuil de détection à 9), ce sont les VE qui contiennent plus de miARN que les Pg-iPS : 54 miARN uniquement retrouvés dans les VE contre 22 dans les Pg-iPS et 77 communs aux deux. En passant d'une intensité d'expression de 6 à 9, les cellules ne possèdent plus que 37% de leurs miARN qui étaient présents au seuil à 6 alors que les VE en conservent 58%. Ces résultats démontrent que les cellules contiennent une population plus diverse de miARN mais qu'une partie d'entre eux est enrichie dans les VE suggérant un réel mécanisme d'empaquetage. Le fait que certains miARN soient uniquement retrouvés dans les VE et non dans les Pg-iPS à un seuil d'intensité élevé (9) suggèrent que ces miARN sont empaquetés de manière disproportionnée dans les VE (54 miARN spécifiquement retrouvés dans les VE). Cette remarque est renforcée par l'observation que les miARN sont plus abondamment présents dans les VE que dans les Pg-iPS à partir d'un seuil d'intensité à environ 7.5.

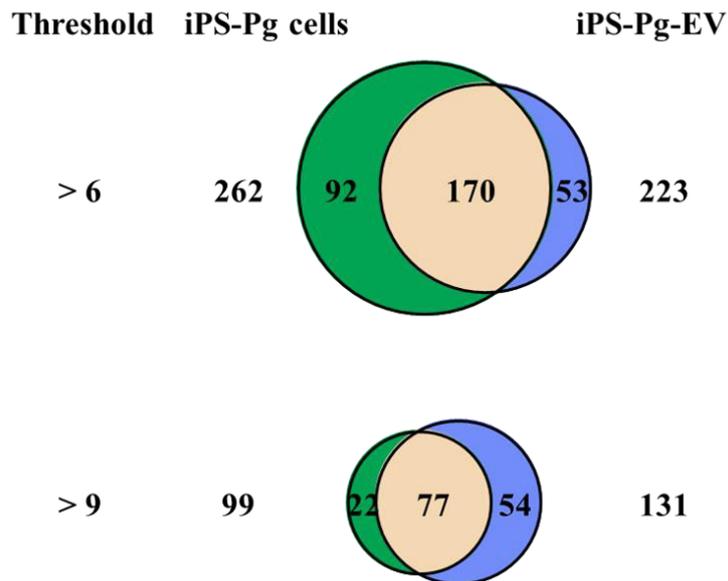
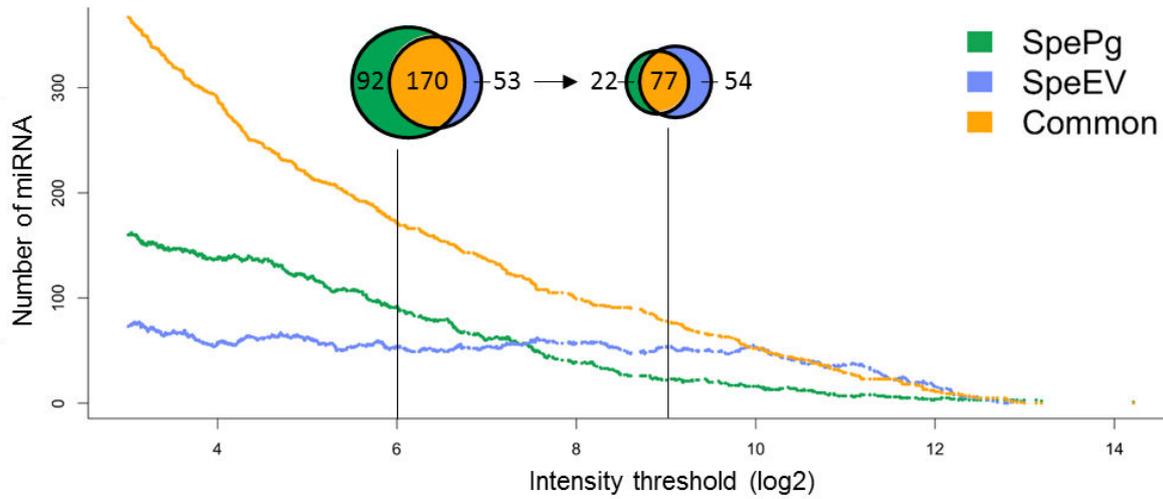


Figure 65 : Analyse du nombre de miARN présents dans les Pg-iPS et dans les VE en fonction de leur intensité d'expression sur la puce (deux différentes représentations).

Dans le but d'identifier les miARN potentiellement impliqués dans les effets thérapeutiques des VE, la liste de miARN présents dans les VE au seuil de détection le plus élevé (à 9) a été analysée en prenant en compte 131 miARN (ceux spécifiquement présents dans les VE et ceux communs aux VE et à leurs cellules mères). Dans cette liste, uniquement les miARN conservés à travers les espèces ont été sélectionnés puisque des VE humaines ont eu un effet sur des cellules de rat *in vitro* (test de viabilité) et sur les cœurs de souris *in vivo*. Cette sélection a été faite grâce au site internet Target Scan (version 7.1, mise à jour en juin 2016). Au total, 16

miARN ont été sélectionnés selon ces critères (Tableau 13). Onze d'entre eux ont été rapportés comme étant stables dans le cœur, des cellules cardiovasculaires (hsa-miR-17-5p, 20a-5p, 103a-3p, 107, 26a-5p, 23a3p, 16-5p) ou musculaires (hsa-miR-106a-5p, 93-5p, 24-3p, 191-5p). De plus, l'un d'entre eux, hsa-miR-103a-3p, a aussi été rapporté comme étant présent et stable dans les VE. Ces miARN seraient impliqués dans des voies de signalisation bénéfiques pour le cœur en IC en stimulant la différenciation, la prolifération et la survie cellulaires, le développement et l'angiogenèse.

miRNA	Intensities (log)				Family
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Avg	
hsa-miR-6088	12.4	12.6	13.0	12.7	miR-143-3p
hsa-miR-92a-3p	11.8	12.1	12.0	12.0	miR-25-3p/32-5p/92-3p/363-3p/367-3p
hsa-miR-17-5p	10.6	11.7	11.4	11.3	miR-17-5p/20-5p/93-5p/106-5p/519-3p
hsa-miR-106a-5p	10.6	11.6	11.3	11.2	
hsa-miR-20a-5p	9.7	11.3	10.8	10.7	
hsa-miR-93-5p	9.8	10.8	10.0	10.3	
hsa-miR-20b-5p	8.7	10.0	9.7	9.6	
hsa-miR-302d-3p	9.6	10.4	10.7	10.3	
hsa-miR-103a-3p	10.1	10.1	10.5	10.3	miR-103-3p/107
hsa-miR-107	8.7	9.5	10.0	9.5	
hsa-miR-24-3p	9.8	10.8	9.6	10.2	miR-24-3p
hsa-miR-191-5p	9.0	10.0	10.2	9.8	miR-191-5p
hsa-miR-26a-5p	6.4	9.7	10.6	9.7	miR-26-5p
hsa-miR-23a-3p	8.2	10.4	9.8	9.7	miR-23-3p
hsa-miR-16-5p	7.8	9.9	9.4	9.2	miR-15-5p/16-5p/195-5p/424-5p/497-5p
hsa-miR-130b-3p	8.8	9.8	8.4	9.1	miR-130-3p/301-3p/454-3p

Tableau 13 : miARN conservés à travers les espèces présents dans les VE de Pg-iPS.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

Cette troisième partie de mon travail de thèse a consisté à étudier l'effet thérapeutique de VE dérivées de Pg-iPS dans le traitement de l'ICC. Le développement de tests fonctionnels *in vitro* a permis de valider l'effet de ces VE avant leur injection *in vivo* et d'identifier leurs mécanismes d'action. Des CM-iPS et Pg-iPS ont aussi été injectés *in vivo* afin de comparer les effets en fonction du stade de maturation des cellules. Dans la mesure où les CM-iPS sécrètent une très faible quantité de VE (observé dans six conditions de culture : trois milieux de culture différents testés en normoxie et en hypoxie à 3% d'O₂), leurs VE n'ont pas été caractérisées *in vitro* et non pas été évaluées *in vivo*.

Les Pg-iPS et CM-iPS ont été directement achetés à la compagnie Cellular Dynamics International. Le phénotype de ces cellules a été confirmé par immuno-histochimie : les Pg-iPS expriment les marqueurs cardiovasculaires précoces tels que MEF2C, NKX2.5 et ISL1 et les CM-iPS sont positifs pour les marqueurs de CM matures tel que MYH7, ACTN2 et TNNT3. Ces résultats ont également été validés par qPCR qui a montré que ces cellules n'expriment plus les marqueurs de pluripotence mais les marqueurs cardiovasculaires précoces et/ou matures.

Les VE de Pg-iPS ont d'abord été caractérisées *in vitro*. L'analyse de la distribution de taille a montré que les Pg-iPS sécrètent principalement des particules de la taille des exosomes (59%) et le rendement moyen est de 17 347 particules sécrétées par cellule. L'analyse par cryo-MET a mis en évidence des VE ayant principalement la taille d'exosomes mais aussi de MP et de corps apoptotiques. Les effets potentiels de ces VE ont été étudiés grâce à la mise en place de tests fonctionnels :

- Les VE incubées avec des cellules H9c2 stressées par une privation de sérum ont permis d'augmenter la viabilité des cellules ;
- Après une cicatrice effectuée dans une monocouche de cellules endothéliales humaines, les VE incubées ont permis de repeupler la cicatrice ;
- Un réseau de tubes de cellules endothéliales humaines a été formé sur une matrice à la suite de l'incubation des VE ;

- Les VE ont la capacité de stimuler la prolifération de CM-CSEh ;
- Les VE n'ont pas induit la transdifférenciation de fibroblastes en CM.

Ensemble, ces données démontrent que les VE sont capables de maintenir la viabilité de cellules dans un environnement stressant et ont un potentiel pro-angiogénique et pro-prolifératif. Ces observations sont d'autant plus intéressantes que ces VE agissent selon un mécanisme dose-dépendant dans l'ensemble des effets positifs observés (à l'exception de la formation de tubes). L'observation de la même intensité thérapeutique dans le test de prolifération avec des VE congelées ou conservées à 4°C puis congelées suggère leur stabilité. Les VE à J2 de culture se sont révélées moins efficaces qu'à J4. Pour démontrer l'interaction des VE avec leurs cellules cibles, les VE marquées à la calcéine-AM ont été visualisées dans le cytoplasme des cellules H9c2, ce qui confirme la possibilité de leur internalisation.

La capacité thérapeutique des VE de Pg-iPS étant validée *in vitro*, elles ont ensuite été évaluées dans le même modèle murin d'ICC que celui utilisé précédemment. Toutefois, les critères d'inclusion dans l'étude ont été réévalués pour sélectionner des souris dont la fonction cardiaque est plus altérée par rapport à l'étude précédente (au moins deux des paramètres suivant : VTS > 40 μ L, VTD > 70 μ L et FE < 45%). Dans cette étude, l'efficacité thérapeutique de 1.4 millions de CM-iPS, de 1.4 millions de Pg-iPS et des VE dérivées de 1.4 millions de Pg-iPS (« fraîches » et congelées) a été comparée par rapport à des souris contrôles traitées au PBS. Les différents traitements ont été directement injectés en zone péri-infarctée sous contrôle échographique. Sept semaines après traitement, aucune différence intergroupe significative n'a été retrouvée. Toutefois, la meilleure évolution de la fonction cardiaque des souris avant et après traitement est observée dans le groupe traité avec les VE. Une comparaison de l'effet des VE congelées et des VE « fraîches » n'a pas montré de différence significative ce qui suggère que la congélation de VE n'altère pas leur efficacité *in vivo*. L'administration de CM-iPS s'est à nouveau révélée sans effet bénéfique sur la fonction cardiaque ce qui confirme les résultats obtenus dans l'étude précédente. En revanche, les Pg-iPS n'ont pas amélioré la fonction cardiaque, contrairement à leurs VE. De manière intéressante, l'évolution du VTS des souris individuelles a montré que les groupes traités avec les cellules (CM-iPS et Pg-iPS) ont des réponses significativement plus variables que le groupe ayant reçu les VE. De plus, le groupe traité avec les VE contient significativement plus de souris ayant répondu positivement au traitement (plus de 5% d'amélioration du VTS) que les autres groupes. La fonction cardiaque

des souris contrôles s'améliore de manière significative, ce qui confirme la capacité de récupération naturelle post-ischémique de la souris.

L'analyse des effets thérapeutiques *in vivo* a été complétée par des analyses macroscopiques, histologiques et transcriptomiques sur les cœurs de souris prélevés à la fin de l'étude. Cependant, les analyses de la taille de l'infarctus (déterminée par les deux méthodes), du nombre de capillaires et d'artérioles et de la taille des CM n'ont pas montré de différences significatives entre les groupes. En revanche, l'analyse de l'expression des gènes a permis de constater que chaque traitement (CM-iPS, Pg-iPS et VE) est associé à une réponse différente du transcriptome cardiaque. L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés par rapport aux contrôles pour chaque traitement a révélé que les gènes associés au traitement par les VE prédisaient des effets positifs en stimulant la viabilité, la survie, la prolifération et la croissance cellulaires, l'angiogenèse et la cardiogenèse et en diminuant l'apoptose et la nécrose des cellules. Ces voies de signalisation activées sont en accord avec les résultats obtenus dans les tests fonctionnels *in vitro*.

Dans une démarche mécanistique, le contenu en miARN de ces VE a été analysé et comparé à celui des Pg-iPS. Les VE sont enrichies en miARN et en contiennent trois fois plus. L'analyse du nombre de miARN présents dans les VE et dans les Pg-iPS en fonction de leur intensité d'expression sur la puce nous a permis de mettre en évidence que certains miARN sont spécifiquement empaquetés dans les VE. Parmi ces miARN, 16 d'entre eux retiennent l'attention puisqu'ils sont hautement exprimés dans les VE et conservés à travers les espèces. Onze d'entre eux auraient des effets cardio-protecteurs et stimuleraient la différenciation cellulaire, la prolifération, la survie, le développement et l'angiogenèse. Ces miARN pourraient être impliqués dans les effets bénéfiques des VE observés *in vitro* et *in vivo*.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a mis en évidence les effets bénéfiques de VE dérivées de Pg-iPS dans un modèle murin d'ICC. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les VE de Pg-CSEh dans la première partie de ma thèse, supportant l'idée que la seule administration des VE permet de reproduire les effets thérapeutiques des cellules d'origine. Le choix du type cellulaire est un critère important qui influe sur l'efficacité des VE. En effet, des VE dérivées de CM et de CSM ont eu des effets neutres sur la fonction cardiaque de souris en ICC alors que des VE provenant de Pg, dérivés de CSEh et de cellules iPS, ont entraîné des effets bénéfiques. Le changement de la source de cellules pluripotentes pour la production des Pg, c'est à dire le passage des CSEh à des cellules iPS, a de nombreux avantages et a permis de résoudre certains problèmes. Tout d'abord, l'approvisionnement des cellules thérapeutiques est devenu plus contrôlé puisque les Pg-iPS ont été directement fournis par la compagnie Cellular Dynamics International (l'obtention des Pg-CSEh était plus complexe avec un rendement variable). De plus, les cultures de Pg-iPS, et donc les préparations de VE, sont plus reproductibles d'une culture à une autre. Mais surtout, l'utilisation de Pg-iPS est une source cellulaire beaucoup plus pertinente d'un point de vue clinique du fait de : 1) la disponibilité illimitée de CS de type iPS et donc des Pg, 2) des restrictions réglementaires plus réduites et des problèmes éthiques contournés, 3) d'une meilleure compatibilité avec une production des cellules et des VE à grande échelle et 4) d'une réduction des problèmes sécuritaires puisque les cellules ne seront plus transplantées aux patients mais utilisées uniquement pour la production des VE. Ce changement était donc nécessaire pour le développement d'une thérapie a-cellulaire basée sur l'administration des VE dérivées de cellules thérapeutiques pour les patients souffrant d'ICC.

Les résultats fonctionnels ont démontré le potentiel thérapeutique des VE de Pg-iPS dans un modèle murin d'ICC après sept semaines de traitement. Ces données confirment les effets protecteurs des VE déjà décrits dans la littérature dans des modèles d'IDM reperfusés (Arslan et al., 2013; Gallet et al., 2017; Lai et al., 2010) et non-reperfusés (Barile et al., 2014; Ibrahim et al., 2014; Khan et al., 2015) ainsi que les résultats obtenus dans notre première étude (VE de Pg-CSEh). Les critères d'inclusion modifiés ont permis de sélectionner des souris plus atteintes par la pathologie avec un VTS moyen de 48.7 μ L, un VTD moyen de 77.5 μ L et une FE moyenne de 37.8% (ces paramètres étant respectivement de 40.6 μ L, 69.8 μ L et 42.0% dans la

deuxième étude). Les paramètres cardiaques tels que le VTS et VTD sont tous deux diminués dans le groupe des souris traitées avec les VE, ce qui est cliniquement pertinent (McManus et al., 2009). De manière intéressante, seul le traitement avec les VE diminue le VTD, ce qui suggère une inversion du remodelage délétère du VG. De plus, l'efficacité thérapeutique de VE « fraîches » ou congelées est similaire ce qui montre que les VE sont stables dans ces conditions (Barile et al., 2014; Ge et al., 2014; Vlassov et al., 2012). Cette constatation est supportée par les effets obtenus *in vitro* et renforce leur utilisation en clinique, en permettant d'envisager une banque de VE thérapeutiques congelées et prêtes à être administrées aux patients.

Les Pg-iPS n'ont pas amélioré la fonction cardiaque des souris en ICC, ce qui est d'autant plus surprenant que les VE provenant de ces cellules ont induit un effet bénéfique et que les données obtenues dans la première étude ont montré un effet fonctionnel similaire des Pg-CSEh et de leurs VE. L'évolution individuelle des souris selon le VTS a permis de constater la réponse hétérogène des souris dans ce groupe de traitement. Plusieurs explications sont possibles : un taux d'apoptose des cellules différent durant les injections, une rétention variable qui peut dépendre de l'inflammation présente dans le myocarde péri-infarci ou une différence dans le nombre de cellules injectées par souris dûe à des agrégats de cellules ou au fait que les cellules sédimentent dans la seringue d'injection contrairement à une suspension de VE qui reste hautement homogène pendant toute la durée des injections. Une autre explication permettant d'interpréter la supériorité des VE par rapport aux Pg-iPS serait la dose de cellules injectées dans le myocarde. En effet, l'essai clinique POSEIDON, qui a comparé 3 doses de CSM dans le traitement de l'IC (20, 100 et 200x10⁶ cellules injectées), a montré que toutes les doses ont permis une amélioration de la capacité physique des patients et une diminution du remodelage, bien que la plus forte dose ait été la moins efficace (Hare et al., 2012). Or, 500 000 Pg-CSEh ont été injectés par souris dans la première étude alors qu'ici 1.4 millions de Pg-iPS ont été administrés, soit près de trois fois plus de cellules que précédemment. Dans ce contexte effet-dose, il serait aussi possible que les cellules greffées n'aient pas eu le temps de sécréter le nombre de VE suffisant pour produire un effet à cause de leur mort prématurée dans le tissu hôte (Bellamy et al., 2015). Le nombre de VE relarguées serait alors nettement inférieur à celui provenant de cellules saines en culture pendant 48 heures. Les tests fonctionnels *in vitro* ont démontré l'effet dose-dépendant des VE ce qui supporte cette idée. Le groupe des CM-iPS a aussi entraîné une amélioration fonctionnelle variable, peut-être dûe à la faible quantité de VE

secrétées si l'on admet que ces vésicules sont les effecteurs principaux des effets paracrines des cellules. De fait, il y a peu d'études dans la littérature sur les VE dérivées de CM et encore moins sur leur effet thérapeutique (Gupta and Knowlton, 2007; Malik et al., 2013). Toutefois, l'efficacité thérapeutique de CM dérivés de CSEh ou d'iPS a par ailleurs été rapportée dans des modèles de pathologies ischémiques (Citro et al., 2014; van Laake et al., 2007) et, à notre connaissance, une seule étude, a suggéré un transfert de matériel génétique médié par les VE de CM. Ces contradictions restent encore difficiles à interpréter.

Les VE ont démontré leur rôle dans la communication intercellulaire en transportant et délivrant des molécules bioactives à leurs cellules cibles (Bobis-Wozowicz et al., 2015; Deregibus et al., 2007; Ratajczak et al., 2006; Valadi et al., 2007). Ces molécules permettraient d'activer des voies de réparation endogènes. Parmi ces biomolécules, on retrouve des protéines, des lipides, du matériel génétique et surtout des miARN (Cantaluppi et al., 2012; Mittelbrunn et al., 2011; Valadi et al., 2007; Yuan et al., 2009). Notre étude conforte ces données. Tout d'abord, la mise en évidence que les VE sont internalisées par leurs cellules cibles démontre leur rôle de navettes. Ensuite, les VE sont enrichies en miARN par rapport à leurs cellules mères. En effet, certains miARN seraient spécifiquement empaquetés dans les VE. D'autres études ont déjà mis en évidence ce mécanisme qui semble contrôlé (Bobis-Wozowicz et al., 2015; Ogawa et al., 2013; Villarroya-Beltri et al., 2013; Vlassov et al., 2012). L'analyse de ces miARN, et notamment ceux qui sont le plus exprimés dans les VE et sont conservés à travers les espèces, prédisent une stimulation des voies de signalisation bénéfiques pour la réparation cardiaque telles que la viabilité, l'angiogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaires. Ces prédictions sont en accord avec les effets des VE retrouvés dans les tests fonctionnels *in vitro* : augmentation de la viabilité de cellules dans un environnement stressant, potentiel pro-angiogénique et pro-prolifératif. Ces effets ont déjà été retrouvés dans les VE dérivées de plusieurs types cellulaires incluant les cellules hématopoïétiques CD34⁺ (Sahoo et al., 2011), les CSM (Arslan et al., 2013; Zhang et al., 2016), les cellules dérivées de cardiosphères (Ibrahim et al., 2014; Tseliou et al., 2015) et les CSE (Khan et al., 2015; Singla, 2016). Enfin, les analyses transcriptomiques sur les cœurs de souris ont montré que chaque traitement affecte l'expression des gènes mais que l'administration des VE induit les plus grands changements associés à une amélioration de la fonction cardiaque. Certains miARN identifiés dans ces VE sont également retrouvés dans les VE dérivées de Pg-CSEh tels que les miARN-302, miARN-17, miARN-130

et miARN-191. Ces miARN pourraient être potentiellement intéressants puisqu'ils sont retrouvés dans les deux types vésiculaires qui ont montré une amélioration de la fonction cardiaque des souris en ICC. Certains d'entre eux sont impliqués dans la prolifération et la maturation de CM (Eulalio et al., 2012). Toutefois, les effets bénéfiques des VE impliquent également sans doute d'autres biomolécules actives telles que les protéines, les lipides et les ARNm (Bobis-Wozowicz et al., 2015; Gangoda et al., 2015; Ibrahim et al., 2014; Seeger et al., 2013).

Les tests fonctionnels *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle pro-angiogénique et pro-prolifératif des VE ainsi que leur effet sur l'augmentation de la survie de cellules stressées. Toutefois, la quantité de VE nécessaire pour produire un effet significatif dépend du type cellulaire. Effectivement, l'effet maximal est atteint à 212 000 VE par cellules H9c2 de rat dans le test de viabilité, 667 000 VE par HUVEC dans le test de cicatrisation (bien que ce ne soit probablement pas l'effet maximal) et à 181 000 VE par CM-CSEh dans le test de prolifération. Chaque VE dérivée d'un type cellulaire possède des caractéristiques spécifiques en termes de composition de protéines et d'expression des marqueurs de surface qui détermine leur interaction avec leurs cellules cibles. L'interaction cellule/VE nécessite donc une complémentarité de leurs marqueurs de surface. Par exemple, des VE dérivées de Pg sont plus préférentiellement internalisées dans des cellules endothéliales et des fibroblastes cardiaques que dans des CM (Gray et al., 2015). Le fait que l'effet observé soit dépendant de la dose de VE incubées pourrait s'expliquer par un effet différentiel du contenu biologique des VE sur les phénomènes impliqués (par exemple, prolifération ou angiogenèse). L'efficacité dépend aussi du type de VE puisque celles issues de fibroblastes n'apportent pas de bénéfices pour la régénération cardiaque (Barile et al., 2014).

Cette étude présente toutefois des limites :

1- Comme dans la première étude évaluant l'effet des VE de Pg-CSEh, l'effet bénéfique est rapporté aux VE totales et non à un sous-type vésiculaire en particulier. Si ce choix a été fondé sur une meilleure comparaison de l'effet des cellules et de leur sécrétome, il serait intéressant, dans une démarche mécanistique, d'étudier l'effet spécifique de chaque sous-type de VE.

2- La fonction cardiaque des souris contrôles est améliorée suggérant un potentiel de régénération naturelle chez la souris, y compris transgénique (détails en p.132). Nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de la densité des vaisseaux sept semaines après traitement par histologie alors que les analyses transcriptomiques suggèrent une surexpression de l'angiogenèse et de la vasculogenèse et les études *in vitro* ont démontré l'effet pro-angiogénique des VE. Ces données contradictoires pourraient être dues à la rapide revascularisation du myocarde grâce au développement de collatérales (Zhang and Faber, 2015) rendant difficile de distinguer les souris contrôles et les souris traitées à un stade avancé (10 semaines après IDM).

3- L'importance thérapeutique de chaque miARN identifié (sur la liste des 16 miARN) n'a pas été explorée. Il serait intéressant de déterminer les effets de chacun d'entre eux pour identifier ceux qui pourraient être particulièrement impliqués dans les effets *in vitro* et *in vivo* observés. Toutefois, il est peu probable que l'effet des VE puisse être rapporté à un seul composé ; il procède plus vraisemblablement de l'effet synergique des différentes biomolécules (ARNm, protéines, lipides) présentes dans les VE et véhiculées dans les cellules-cibles. Dans un premier temps, et plutôt que de procéder à une déconstruction de ce contenu pour isoler spécifiquement ses constituants, il serait plus intéressant de détruire l'ensemble des ARN contenus dans les VE et d'observer si les effets bénéfiques *in vitro* sont neutralisés. Si tel est le cas, cela démontrerait leur implication dans les effets des VE.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de valider l'importance des VE dans le mécanisme d'action paracrine des cellules. Les VE de Pg-iPS se sont révélées efficaces dans le traitement de l'ICC, possiblement, et en partie, grâce à leur signature spécifique en miARN qui pourraient être impliqués dans des voies de signalisation cardio-protectrices.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA QUATRIEME PARTIE

Arslan, F., Lai, R.C., Smeets, M.B., Akeroyd, L., Choo, A., Agnor, E.N.E., Timmers, L., van Rijen, H.V., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., et al. (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 10, 301–312.

Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 103, 530–541.

Bellamy, V., Vanneaux, V., Bel, A., Nemetalla, H., Emmanuelle Boitard, S., Farouz, Y., Joanne, P., Perier, M.-C., Robidel, E., Mandet, C., et al. (2015). Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 34, 1198–1207.

Bobis-Wozowicz, S., Kmiotek, K., Sekula, M., Kedracka-Krok, S., Kamycka, E., Adamiak, M., Jankowska, U., Madetko-Talowska, A., Sarna, M., Bik-Multanowski, M., et al. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 2748–2761.

Burridge, P.W., Matsu, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., et al. (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* 11, 855–860.

Cantaluppi, V., Gatti, S., Medica, D., Figliolini, F., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Biancone, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 82, 412–427.

Citro, L., Naidu, S., Hassan, F., Kuppusamy, M.L., Kuppusamy, P., Angelos, M.G., and Khan, M. (2014). Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PloS One* 9, e116281.

Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., and Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440–2448.

Eulalio, A., Mano, M., Dal Ferro, M., Zentilin, L., Sinagra, G., Zacchigna, S., and Giacca, M. (2012). Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492, 376–381.

Gallet, R., Dawkins, J., Valle, J., Sinsolo, E., de Couto, G., Middleton, R., Tseliou, E., Luthringer, D., Kreke, M., Smith, R.R., et al. (2017). Exosomes secreted by cardiosphere-

derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 38, 201–211.

Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., and Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics* 15, 260–271.

Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X., and Lu, Z. (2014). miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Mol. Basel Switz.* 19, 1568–1575.

Gray, W.D., French, K.M., Ghosh-Choudhary, S., Maxwell, J.T., Brown, M.E., Platt, M.O., Searles, C.D., and Davis, M.E. (2015). Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ. Res.* 116, 255–263.

Gupta, S., and Knowlton, A.A. (2007). HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 292, H3052–H3056.

Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D.L., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P.V., Brinker, J.A., et al. (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308, 2369–2379.

Ibrahim, A.G.-E., Cheng, K., and Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* 2, 606–619.

Khan, M., Nickoloff, E., Abramova, T., Johnson, J., Verma, S.K., Krishnamurthy, P., Mackie, A.R., Vaughan, E., Garikipati, V.N.S., Benedict, C., et al. (2015). Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ. Res.* 117, 52–64.

van Laake, L.W., Passier, R., Monshouwer-Kloots, J., Verkleij, A.J., Lips, D.J., Freund, C., den Ouden, K., Ward-van Oostwaard, D., Korving, J., Tertoolen, L.G., et al. (2007). Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 1, 9–24.

Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4, 214–222.

Malik, Z.A., Kott, K.S., Poe, A.J., Kuo, T., Chen, L., Ferrara, K.W., and Knowlton, A.A. (2013). Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H954-965.

McManus, D.D., Shah, S.J., Fabi, M.R., Rosen, A., Whooley, M.A., and Schiller, N.B. (2009). Prognostic value of left ventricular end-systolic volume index as a predictor of heart failure hospitalization in stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* 22, 190–197.

- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., and Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282.
- Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M., and Yanoshita, R. (2013). Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 66–75.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487–1495.
- Sahoo, S., Klychko, E., Thorne, T., Misener, S., Schultz, K.M., Millay, M., Ito, A., Liu, T., Kamide, C., Agrawal, H., et al. (2011). Exosomes From Human CD34+ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity Novelty and Significance. *Circ. Res.* 109, 724–728.
- Seeger, F.H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2013). MicroRNAs in stem cell function and regenerative therapy of the heart. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1739–1746.
- Singla, D.K. (2016). Stem cells and exosomes in cardiac repair. *Curr. Opin. Pharmacol.* 27, 19–23.
- Tseliou, E., Fouad, J., Reich, H., Slipczuk, L., Couto, G. de, Aminzadeh, M., Middleton, R., Valle, J., Weixin, L., and Marbán, E. (2015). Fibroblasts Rendered Antifibrotic, Antiapoptotic, and Angiogenic by Priming With Cardiosphere-Derived Extracellular Membrane Vesicles. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 599–611.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 940–948.
- Yuan, A., Farber, E.L., Rapoport, A.L., Tejada, D., Deniskin, R., Akhmedov, N.B., and Farber, D.B. (2009). Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PloS One* 4, e4722.
- Zhang, H., and Faber, J.E. (2015). De-novo collateral formation following acute myocardial infarction: Dependence on CCR2+ bone marrow cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 4–16.
- Zhang, Z., Yang, J., Yan, W., Li, Y., Shen, Z., and Asahara, T. (2016). Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J. Am. Heart Assoc.* 5, e002856.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. Conclusion du projet de thèse et retombées cliniques

Mon projet de thèse a permis d'enrichir les connaissances actuelles sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la régénération cardiaque tout en lui apportant une nouvelle dimension. A l'origine, la thérapie cellulaire cardiaque avait pour but d'apporter des cellules viables et fonctionnelles dans la zone infarctée afin de la repeupler et lui redonner sa fonctionnalité d'origine. Cependant, il s'est avéré que les cellules mourraient précocement dans le tissu hôte malgré un bénéfice fonctionnel qui perdurait dans le temps (Bellamy et al., 2015). Notre laboratoire s'est alors interrogé sur cette observation et a émis l'hypothèse que les cellules sécrèteraient des facteurs permettant de stimuler des voies de réparation endogènes, en s'appuyant sur les données de la littérature (Mirotsov et al., 2011; Timmers et al., 2007, 2011). Parmi ces facteurs, un réel intérêt était porté aux VE libérées par ces cellules, incluant les exosomes, les MP et les corps apoptotiques (Lai et al., 2010). Ces VE seraient impliquées dans la communication intercellulaire en jouant un rôle de navette qui permettrait de transférer dans les cellules cibles des molécules bioactives capables de stimuler des voies de réparation endogènes (Chen et al., 2013; Sahoo et al., 2011; Vrijssen et al., 2010; Yuan et al., 2009). D'autres études avaient démontré leurs effets bénéfiques, notamment dans le traitement de l'ICC, sous forme d'une diminution de la taille de l'infarctus, l'étendue de la fibrose, l'apoptose et d'une amélioration de la fonction contractile, de l'angiogenèse et de la prolifération de CM (Arslan et al., 2013; Barile et al., 2014; Chen et al., 2013; Gallet et al., 2017; Ibrahim et al., 2014; Sahoo et al., 2011). C'est ainsi qu'est née l'idée de remplacer la thérapie cellulaire par une thérapie basée sur la seule administration des VE dérivées de cellules thérapeutiques pour le traitement de l'ICC, ce qui offrirait de nombreux avantages d'un point de vue clinique.

Dans le but de développer une thérapie a-cellulaire, le premier objectif était de comparer les effets thérapeutiques de Pg-CSEh avec ceux de leurs VE. Ces cellules n'ont pas été choisies au hasard ; elles ont déjà démontré leurs effets bénéfiques dans un modèle animal d'ICC et font actuellement l'objet d'un essai clinique (Bellamy et al., 2015; Menasché et al., 2015). Le potentiel thérapeutique des VE de Pg-CSEh a été confirmé dans un modèle murin d'ICC. Cette première étape indiquant la non-infériorité des VE par rapport à leurs cellules mères a permis

de mettre en évidence le rôle majeur des VE dans la communication intercellulaire et de supporter le développement d'une thérapie basée uniquement sur leur administration. Ces résultats ont été publiés dans le *Journal of Heart and Lung Transplantation* et j'en suis le premier auteur (Kervadec et al., 2016) (Annexe 2). Dans le but d'optimiser cette thérapie, des VE dérivées de différents types cellulaires (CM-iPS et des CSM) ont été testées afin d'identifier la source cellulaire sécrétant les VE associées aux meilleurs bénéfices fonctionnels. Cependant, les résultats *in vivo* ont été négatifs, ce qui a confirmé l'importance du type cellulaire. Enfin, des VE dérivées de Pg-iPS ont été testées et se sont révélées efficaces dans le traitement de l'ICC. Des tests *in vitro* ont montré qu'elles avaient un potentiel pro-angiogénique, pro-prolifératif et pouvaient stimuler la viabilité de cellules dans un environnement stressant. Leur efficacité pourrait être, en partie, due à leur contenu spécifique en miARN. Cette étude a permis de confirmer l'implication des VE dans le mécanisme paracrine des cellules. Un deuxième article présentant ces données a été soumis à l'*European Heart Journal* et est actuellement en cours de révision (El Harane N*, Kervadec A* et al., co-premier auteurs).

L'ensemble de ce projet a permis d'envisager une thérapie a-cellulaire pour le traitement de l'ICC. Les Pg-iPS pourraient alors avoir un nouveau rôle prometteur dans la médecine régénérative, à savoir la production de VE thérapeutiques, ce qui permettrait d'éviter les problèmes sécuritaires associés à leur transplantation chez les patients. L'utilisation thérapeutique des VE suscite actuellement un intérêt croissant en raison de leurs avantages sur la transplantation de cellules : une caractérisation précise et plus standardisée, une meilleure reproductibilité, une possibilité d'une production à grande échelle, une stabilité après cryo-conservation, une absence *à priori* de risque tumoral et une immunogénicité semblant faible. Ces avantages les rapprochent du modèle pharmaceutique d'un "médicament biologique", ce qui pourrait se traduire par une diminution des coûts de production et une plus grande dissémination de la technique. Actuellement, deux essais cliniques basés sur les VE ont été menés ; ils utilisent des exosomes dérivés de cellules dendritiques pour le traitement de mélanomes métastatiques et pour la maintenance de l'immunothérapie après chimiothérapie chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules inopérable (Besse et al., 2016; Escudier et al., 2005). A défaut de démontrer l'efficacité, ces études ont été rassurantes sur le plan de la tolérance.

2. Perspectives cliniques

Toutefois, ces résultats prometteurs nécessitent d'autres investigations et certains points restent à éclaircir avant une utilisation clinique des VE de Pg-iPS :

1- L'une des limites rencontrées a été le modèle murin d'ICC. En effet, ce modèle ne permet pas de refléter la physiologie cardiaque chez l'homme (récupération fonctionnelle innée, rapidité de la fréquence cardiaque, cœur de petite taille, homogénéité génétique). Nous avons toutefois pu mettre en évidence l'efficacité thérapeutique des VE dérivées de Pg-CSEh et de Pg-iPS ainsi que leur supériorité par rapport aux VE de CM-iPS et de CSM. Un autre modèle animal est en train d'être développé au laboratoire qui est un modèle d'ICC par ischémie/reperfusion chez le rat. Il aura l'avantage d'être plus pertinent d'un point de vue clinique puisqu'aujourd'hui, la plupart des IDM sont reperfusés dans les premières heures après leur survenue, mais peuvent laisser des dommages cellulaires et fonctionnels dus à l'ischémie ou à la procédure de revascularisation. Dans une perspective plus lointaine, le passage à un gros animal tel que le porc permettra de valider l'efficacité thérapeutique et l'absence d'effets secondaires. Cette étape est nécessaire puisque ces modèles se rapprochent beaucoup plus de la physiologie humaine et représentent la meilleure des évaluations d'un traitement donné avant le commencement d'un essai clinique chez l'homme (Lara-Pezzi et al., 2015).

2- Le matériel thérapeutique doit être compatible pour une utilisation clinique. Les cellules Pg-iPS utilisée durant ma thèse étant de grade recherche, un partenariat avec l'industriel a permis de générer des cellules de grade clinique répondant aux normes BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication ou *GMP, Good Manufacturing Practice*). De plus, d'autres règles doivent être respectées pour l'évaluation préclinique (BPL pour Bonnes Pratiques de Laboratoire ; *GLP, Good Laboratory Practice*) et pour la bonne conduite des essais cliniques (BPC pour Bonnes Pratiques Cliniques ; *GCP, Good Clinical Practice*). Les efforts du laboratoire se concentrent aujourd'hui sur l'identification d'un milieu de culture de grade clinique ainsi que sur les conditions de culture (normoxie ou hypoxie), permettant de produire les VE les plus efficaces possibles pour le traitement de l'ICC.

3- Une caractérisation maximale du produit thérapeutique est nécessaire. Il est prévu d'identifier le contenu protéique et lipidique des VE de Pg-iPS. De plus, l'évaluation de leur potentiel immunogène représente une étape cruciale. Les résultats préliminaires du laboratoire

ont démontré que les VE (de grade recherche) sont associées à une très faible réponse immunogène. Ce paramètre simplifierait leur utilisation en clinique en éliminant ou en réduisant l'administration d'immunosuppresseurs et leurs effets secondaires.

4- L'un des défis à relever pour faciliter le passage du produit thérapeutique en clinique reste la production à grande échelle. En effet, bien que l'ultracentrifugation représente la méthode de référence pour la production des VE, elle ne peut être appliquée à une utilisation clinique. De plus, des protéines sont susceptibles d'être culotées en même temps que les VE et peuvent entraîner des effets confondants. D'autres méthodes d'isolation permettent d'obtenir un rendement et une pureté plus élevés comme la chromatographie d'exclusion de taille (Chen et al., 2010; Nordin et al., 2015) ou la filtration tangentielle qui permet de concentrer les VE dans un minimum de volume (Arslan et al., 2013; Lai et al., 2010). De plus, une expansion des cellules en bioréacteur permettrait d'augmenter considérablement la quantité de MC et donc des VE isolées (Chen et al., 2014). Une autre stratégie au potentiel prometteur serait d'immortaliser des cellules thérapeutiques pour assurer un approvisionnement infini des cellules et donc de leurs VE (Chen et al., 2011). Elle permettrait de réduire les coûts de production et de caractérisation des cellules nécessaire à chaque culture et de réduire les temps de production des cellules. Il est possible que ces changements dans les méthodes d'isolation des VE influent sur leur efficacité thérapeutique ; il sera donc indispensable de caractériser les VE et de tester leur fonctionnalité dans les tests *in vitro* au préalable.

5- Enfin, la méthode optimale d'administration des VE doit être déterminée. Près de 90% des cellules administrées par injections intracardiaques sont perdues dans la circulation sanguine (Laflamme and Murry, 2005). Cette observation s'applique probablement également aux VE. Dans le but d'optimiser l'administration des VE dans le myocarde, elles pourraient être incorporées dans un patch greffé sur le myocarde infarci. Cette méthode pourrait permettre de contrôler la libération des VE dans le temps en fonction de la dégradation du patch. De plus, elle a déjà démontré sa faisabilité dans les projets précédents du laboratoire et représente la méthode d'apport des cellules dans l'essai clinique en cours (Pg-CSEh enrobés dans un patch de fibrine greffé sur le myocarde infarci) (Bellamy et al., 2015; Menasché et al., 2015). L'incorporation dans un biomatériau devra cependant respecter l'intégrité des VE pour qu'elles

puissent continuer à exercer leur rôle de navette avec la même efficacité (Alvarez-Erviti et al., 2011a; Gray et al., 2015).

3. Perspectives scientifiques

En seulement quelques années, le champ d'investigation des VE a connu un réel essor et a su bousculer les dogmes de la thérapie cellulaire. Toutefois, de nombreuses questions restent sans réponses, ce qui nécessite de continuer nos recherches. D'autres expériences seraient en effet utiles à la compréhension des mécanismes d'action des VE :

1- L'identification de la sous-population de VE associée aux effets bénéfiques des VE (exosomes, MP, corps apoptotiques ou leur combinaison). Actuellement, il est difficile de répondre à cette question puisque les outils disponibles ne permettent pas de séparer et de caractériser avec une discrimination suffisante les différents types vésiculaires. Toutefois, il est possible d'enrichir un sous-type par rapport à un autre en combinant différentes stratégies (Kowal et al., 2016). De nombreuses études s'intéressent cependant plus particulièrement aux exosomes et accordent un faible rôle aux autres types de VE. Les exosomes sont impliqués dans de nombreux phénomènes et recouvrent des champs d'application variés (Bruno et al., 2012; Ibrahim et al., 2014; Nojima et al., 2016; Vlassov et al., 2012; Xin et al., 2017). Les résultats obtenus dans ce projet vont dans ce sens puisque les CSM, dont les VE sont associées à une absence d'amélioration fonctionnelle, ont sécrété principalement des particules de la taille des MP, alors que les Pg-CSEh et Pg-iPS ont libéré principalement des particules de la taille des exosomes.

2- Explorer davantage les effets des VE :

- sur la contractilité des CM : plusieurs expériences ont été réalisées lors de mon deuxième séjour dans le laboratoire du Pr Mercola et du Dr Colas au Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute à la Jolla. L'incubation des VE de Pg-iPS semble moduler contractilité des CM-iPS. D'autres analyses et expériences supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser leurs effets sur ce paramètre ;
- sur l'électrophysiologie cardiaque : des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Ruben Coronel de l'Academic Medical Center aux Pays-Bas. Les VE incubées avec des myocytes ventriculaires de rats nouveau-nés ont

permis d'augmenter leur vitesse de conduction. Une étude *in vivo* est actuellement en cours d'analyse, où la conductance des cœurs de souris présentant une ICC a été mesurée après traitement avec des VE de Pg-iPS (versus PBS en tant que contrôle). Sur les 88 souris infarciées, 7 d'entre elles appartenant au groupe contrôle, 8 ayant reçu les VE, 4 témoins d'IDM (*sham*) et 5 non-opérées sont en train d'être analysées par nos collaborateurs ;

- sur la prolifération des CM *in vivo* : un modèle de souris transgénique MerCreMer-Zeg, actuellement en élevage au laboratoire, permet de déterminer si les effets des VE passent par une réinduction du cycle mitotique des CM déjà existants ou par une mobilisation des cellules souches/progénitrices endogènes (Loffredo et al., 2011). Des études sont actuellement en cours sur ce modèle. Selon la littérature, la prolifération de CM déjà différenciés serait le mécanisme le plus probablement impliqué dans la régénération cardiaque (Jopling et al., 2010; Porrello et al., 2011; Poss et al., 2002). Ces données sont appuyées par nos études *in vitro* où le rôle pro-prolifératif des VE a été démontré sur des CM-CSEh. Il serait maintenant intéressant d'étudier la prolifération induite par les VE sur d'autres types cellulaires, tels que des Pg, des cellules endothéliales ou encore des fibroblastes. D'autres études ont montré une différenciation des cellules progénitrices dans la régénération cardiaque mais ce processus est de plus en plus controversé (Beltrami et al., 2003). La capacité de différenciation des Pg en CM par les VE a été étudiée au cours de mon second voyage dans le laboratoire du Pr Colas et les données obtenues sont très mitigées et suggèrent plutôt que les VE agiraient via un mécanisme de prolifération plus que de différenciation ;
- sur l'immunogénicité des VE : des études sont actuellement en cours au laboratoire par la doctorante Nadia El Harane,

3- Etudier le contenu des VE et déterminer les biomolécules impliquées dans leurs effets bénéfiques. Les VE sont extrêmement riches en biomolécules et il est très probable que leurs effets ne se limitent pas à ceux d'un seul facteur mais impliquent un ensemble de facteurs agissant en synergie (Bobis-Wozowicz et al., 2015; Gangoda et al., 2015; Ibrahim et al., 2014; Seeger et al., 2013). Pour explorer l'implication du matériel génétique, un traitement à la RNase permettrait de détruire les ARN totaux et d'en mesurer la conséquence sur les effets fonctionnels des VE. Certaines études ont déjà démontré l'implication des ARN grâce à ce type

d'expériences (Aliotta et al., 2010). L'implication plus spécifique des miARN pourrait être évaluée par une inhibition du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), qui est impliqué dans la stabilité des miARN (Gray et al., 2015), dans les cellules thérapeutiques. Toutefois, l'inhibition des miARN dans les VE, en éliminant l'ensemble des miARN des cellules thérapeutiques, pourrait entraîner des effets indésirables et perturber la machinerie cellulaire. Une autre approche serait d'inhiber plusieurs miARN qui semblent avoir un rôle important par transfection d'anti-miARN dans les cellules thérapeutiques. Plusieurs combinaisons d'inhibition, impliquant les 16 miARN les plus exprimés dans les VE de Pg-iPS, pourraient être ainsi testées. La même approche pourrait être envisagée pour étudier l'implication de certaines protéines en inhibant l'ARNm d'une protéine par transfection de siARN (Zhao et al., 2008).

4. Nouveaux champs d'application

Au-delà de l'utilisation des VE comme une alternative à la transplantation de cellules, les VE pourraient avoir de nouveaux rôles. Agissant en véritables navettes, les VE peuvent être utilisées pour délivrer des molécules spécifiques et bioactives à des cellules ou à un organe (Armstrong et al., 2017). Leur contenu peut être modifié et enrichi en molécules thérapeutiques afin de les véhiculer aux cellules cibles. Cela a déjà été démontré par Sun et al. où des VE enrichies en curcumine transfèrent cet antioxydant aux cellules inflammatoires et diminuent la réponse inflammatoire de manière plus efficace que l'administration seule de curcumine *in vitro* et *in vivo* (Sun et al., 2010). Les VE pourraient ainsi transporter plusieurs molécules thérapeutiques permettant de moduler l'activité de multiples voies de signalisation dans les cellules cibles. Au contraire, des VE transfectées avec un siARN dirigé contre un gène d'intérêt (gène impliqué dans une pathologie par exemple) peuvent diminuer l'expression localisée de ce gène (Alvarez-Erviti et al., 2011b; Lakhali and Wood, 2011). Les protéines de surface des VE peuvent aussi être modifiées afin de cibler la (ou les) population(s) de cellules cibles pour augmenter l'efficacité de la thérapie (Alvarez-Erviti et al., 2011b; Xitong and Xiaorong, 2016). Les VE sont alors injectables par voie intraveineuse ce qui facilite considérablement l'administration du produit thérapeutique.

De plus, les chercheurs s'intéressent au développement de vésicules artificielles. Une récente étude a montré que des cellules contraintes de passer dans une extrudeuse permettent de générer 30 fois plus de VE ayant les mêmes caractéristiques et capacités thérapeutiques que les VE naturelles (Kim et al., 2017).

En combinant les paramètres précédents, la thérapie basée sur les VE pour le traitement de l'ICC pourrait être améliorée en enrichissant le contenu des VE avec des molécules bioactives et thérapeutiques et en modifiant les récepteurs de surface des VE pour cibler les cellules cardiaques. La génération de VE artificielles permettrait d'augmenter considérablement le rendement et diminuerait sans doute les coûts de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE DE LA CONCLUSION GENERALE

- Aliotta, J.M., Pereira, M., Johnson, K.W., de Paz, N., Dooner, M.S., Puente, N., Ayala, C., Brilliant, K., Berz, D., Lee, D., et al. (2010). Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp. Hematol.* *38*, 233–245.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A.H., Gardiner, C., Sargent, I.L., Wood, M.J.A., and Cooper, J.M. (2011a). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* *42*, 360–367.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., and Wood, M.J.A. (2011b). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* *29*, 341–345.
- Armstrong, J.P.K., Holme, M.N., and Stevens, M.M. (2017). Re-Engineering Extracellular Vesicles as Smart Nanoscale Therapeutics. *ACS Nano* *11*, 69–83.
- Arslan, F., Lai, R.C., Smeets, M.B., Akeroyd, L., Choo, A., Agur, E.N.E., Timmers, L., van Rijen, H.V., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., et al. (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* *10*, 301–312.
- Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *103*, 530–541.
- Bellamy, V., Vanneaux, V., Bel, A., Nemetalla, H., Emmanuelle Boitard, S., Farouz, Y., Joanne, P., Perier, M.-C., Robidel, E., Mandet, C., et al. (2015). Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *34*, 1198–1207.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., et al. (2003). Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* *114*, 763–776.
- Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Le Chevalier, T., Livartoski, A., Barlesi, F., Laplanche, A., et al. (2016). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* *5*, e1071008.
- Bobis-Wozowicz, S., Kmiotek, K., Sekula, M., Kedracka-Krok, S., Kamycka, E., Adamiak, M., Jankowska, U., Madetko-Talowska, A., Sarna, M., Bik-Multanowski, M., et al. (2015). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 2748–2761.

Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Biancone, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PloS One* 7, e33115.

Chen, K.G., Mallon, B.S., McKay, R.D.G., and Robey, P.G. (2014). Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics. *Cell Stem Cell* 14, 13–26.

Chen, L., Wang, Y., Pan, Y., Zhang, L., Shen, C., Qin, G., Ashraf, M., Weintraub, N., Ma, G., and Tang, Y. (2013). Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 566–571.

Chen, T.S., Lai, R.C., Lee, M.M., Choo, A.B.H., Lee, C.N., and Lim, S.K. (2010). Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 38, 215–224.

Chen, T.S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S.S., Lai, R.C., Choo, A.B.H., Padmanabhan, J., Lee, C.N., de Kleijn, D.P.V., and Lim, S.K. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *J. Transl. Med.* 9, 47.

Escudier, B., Dorval, T., Chaput, N., André, F., Caby, M.-P., Novault, S., Flament, C., Leboulleire, C., Borg, C., Amigorena, S., et al. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* 3, 10.

Gallet, R., Dawkins, J., Valle, J., Simsolo, E., de Couto, G., Middleton, R., Tseliou, E., Luthringer, D., Kreke, M., Smith, R.R., et al. (2017). Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 38, 201–211.

Gangoda, L., Boukouris, S., Liem, M., Kalra, H., and Mathivanan, S. (2015). Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics* 15, 260–271.

Gray, W.D., French, K.M., Ghosh-Choudhary, S., Maxwell, J.T., Brown, M.E., Platt, M.O., Searles, C.D., and Davis, M.E. (2015). Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circ. Res.* 116, 255–263.

Ibrahim, A.G.-E., Cheng, K., and Marbán, E. (2014). Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* 2, 606–619.

Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606–609.

Kervadec, A., Bellamy, V., El Harane, N., Arakélian, L., Vanneaux, V., Cacciapuoti, I., Nemetalla, H., Périer, M.-C., Toeg, H.D., Richart, A., et al. (2016). Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the

treatment of chronic heart failure. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 35, 795–807.

Kim, Y.-S., Kim, J.-Y., Cho, R., Shin, D.-M., Lee, S.W., and Oh, Y.-M. (2017). Adipose stem cell-derived nanovesicles inhibit emphysema primarily via an FGF2-dependent pathway. *Exp. Mol. Med.* 49, e284.

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E968-977.

Laflamme, M.A., and Murry, C.E. (2005). Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* 23, 845–856.

Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., et al. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 4, 214–222.

Lakhal, S., and Wood, M.J.A. (2011). Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery: exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 33, 737–741.

Lara-Pezzi, E., Menasché, P., Trouvin, J.-H., Badimón, L., Ioannidis, J.P.A., Wu, J.C., Hill, J.A., Koch, W.J., De Felice, A.F., de Waele, P., et al. (2015). Guidelines for translational research in heart failure. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 8, 3–22.

Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Gannon, J., and Lee, R.T. (2011). Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell* 8, 389–398.

Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* 36, 2011–2017.

Mirotsov, M., Jayawardena, T.M., Schmeckpeper, J., Gneccchi, M., and Dzau, V.J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 280–289.

Nojima, H., Freeman, C.M., Schuster, R.M., Japtok, L., Kleuser, B., Edwards, M.J., Gulbins, E., and Lentsch, A.B. (2016). Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J. Hepatol.* 64, 60–68.

Nordin, J.Z., Lee, Y., Vader, P., Mäger, I., Johansson, H.J., Heusermann, W., Wiklander, O.P.B., Hällbrink, M., Seow, Y., Bultema, J.J., et al. (2015). Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 879–883.

- Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078–1080.
- Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188–2190.
- Sahoo, S., Klychko, E., Thorne, T., Misener, S., Schultz, K.M., Millay, M., Ito, A., Liu, T., Kamide, C., Agrawal, H., et al. (2011). Exosomes From Human CD34+ Stem Cells Mediate Their Proangiogenic Paracrine Activity. *Novelty and Significance. Circ. Res.* 109, 724–728.
- Seeger, F.H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2013). MicroRNAs in stem cell function and regenerative therapy of the heart. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1739–1746.
- Sun, D., Zhuang, X., Xiang, X., Liu, Y., Zhang, S., Liu, C., Barnes, S., Grizzle, W., Miller, D., and Zhang, H.-G. (2010). A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1606–1614.
- Timmers, L., Lim, S.K., Arslan, F., Armstrong, J.S., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J., El Oakley, R.M., Choo, A., Lee, C.N., et al. (2007). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res.* 1, 129–137.
- Timmers, L., Lim, S.K., Hofer, I.E., Arslan, F., Lai, R.C., van Oorschot, A.A.M., Goumans, M.J., Strijder, C., Sze, S.K., Choo, A., et al. (2011). Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 6, 206–214.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 940–948.
- Vrijisen, K.R., Sluijter, J.P.G., Schuchardt, M.W.L., van Balkom, B.W.M., Noort, W.A., Chamuleau, S. a. J., and Doevendans, P. a. F.M. (2010). Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1064–1070.
- Xin, H., Wang, F., Li, Y., Lu, Q.-E., Cheung, W.L., Zhang, Y., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2017). Secondary Release of Exosomes From Astrocytes Contributes to the Increase in Neural Plasticity and Improvement of Functional Recovery After Stroke in Rats Treated With Exosomes Harvested From MicroRNA 133b-Overexpressing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Transplant.* 26, 243–257.
- Xitong, D., and Xiaorong, Z. (2016). Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases. *Gene* 575, 377–384.
- Yuan, A., Farber, E.L., Rapoport, A.L., Tejada, D., Deniskin, R., Akhmedov, N.B., and Farber, D.B. (2009). Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PloS One* 4, e4722.

Zhao, M., Yang, H., Jiang, X., Zhou, W., Zhu, B., Zeng, Y., Yao, K., and Ren, C. (2008). Lipofectamine RNAiMAX: An Efficient siRNA Transfection Reagent in Human Embryonic Stem Cells. *Mol. Biotechnol.* *40*, 19–26.

CONTRIBUTION AU PROJET

Ce projet fut un travail d'équipe et n'aurait pas pu avoir lieu sans l'aide de :

- Dr Nisa Renault : expériences *in vivo*,
- Valérie Bellamy : cultures cellulaires et test de viabilité,
- Nadia El Harane : tests d'angiogenèse et mise en évidence de l'internalisation des VE,
- Laetitia Pidial : internalisation des VE,
- Etudiants en Master 2 : Bruna Lima Correa, Léa Thiebault, Jeanne Gauthier,
Alexandra Tan Bourdillon

PUBLICATIONS

- Articles publiés

2. Ngkelo A, Richart A, Kirk JA, Bonnin P, Vilar J, Lemitre M, Marck P, Branchereau M, Le Gall S, Renault N, Guerin C, Ranek MJ, **Kervadec A**, Danelli L, Gautier G, Blank U, Launay P, Camerer E, Bruneval P, Menasche P, Heymes C, Luche E, Casteilla L, Cousin B, Rodewald HR, Kass DA, Silvestre JS. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *Journal of Experimental Medicine*. **2016** Jun 27;213(7):1353-74.

1. **Kervadec A**, Bellamy V, El Harane N, Arakélian L, Vanneaux V, Cacciapuoti I, Nemetalla H, Richard A, Périer MC, Toeg H, Lemitre M, Yin M, Loyer X, Larghero J, Hagège A, Ruel M, Boulanger CM, Silvestre JS, Menasché P, Renault NK. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. **2016** Jun;35(6):795-807.

- Résumés publiés

3. Renault N, **Kervadec A**, Bellamy V, El Harane N, Thiebault L, Nematalla H, Pidial L, Lemitre M, Cagnard N, Smit N, Meijborg V, Brunaud C, Renault M, Colas A, Hagège A, Coronel R, Mercola M, Silvestre JS, Menasché P. Extracellular vesicles secreted by human cardiac progenitors are an effective alternative To Cell Transplantation For Chronic Heart Failure. *Circulation* **2016**; 134 (suppl 1): A16533.

2. **Kervadec A**, Bellamy V, El Harane N, Smit N, Meijborg V, Nematalla H, Périer MC, Renault M, Colas A, Hagège A, Coronel R, Mercola M, Silvestre JS, Philippe Menasché P, Renault N. Extracellular vesicles as effective substitutes for cell therapy for chronic heart failure. *European Heart Journal - European Society of Cardiology Congress Supplement* **2016**; 37 (suppl 1): 397.

1. Renault N, **Kervadec A**, Toeg H, Loyer X, Nemetalla H, Yin M, Arakélian L, Périer MC, Bellamy V, El Harane N, Vanneaux V, Larghero J, Hagège A, Ruel M, Silvestre JS, Menasché P. Can the Functional Benefits of Cardiac Progenitor Cells be Equaled by Their Secreted Extracellular Vesicle? *Circulation* **2014**; 130-A11432.

- Article soumis

El Harane N*, Kervadec A*, (*co-premier auteurs), Bellamy V, Pidial L, Nematalla H, Perier MC, Lima-Correa B, Thiebault L, Cagnard N, Brunaud C, Lemitre M, Gauthier J, Tan Bourdillon A, Renault M, Hovhannisyann Y, Agbulut O, Hagège A, Silvestre JS, Menasché P, Renault N. Acellular therapeutic approach for heart failure: *in vitro* production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. Soumis à l'*European Heart Journal* (en revision), **2017**.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

- Présentations internationales (*Orateur)

5. Renault N*, **Kervadec A**, Bellamy V, Nadia El Harane N, Thiebault L, Nematalla H, Pidial L, Lemitre M, Cagnard N, Smit N, Meijborg V, Brunaud C, Renault M, Colas A, Hagège A, Coronel R, Mercola M, Silvestre JS, Menasché P. Extracellular vesicles secreted by human cardiac progenitors are an effective alternative to cell transplantation for chronic heart failure. Présentation d'un poster. *American Heart Association Scientific Sessions 2016*, New Orleans, LA, USA, Nov 12-16, **2016**.

4. **Kervadec A***, Bellamy V, El Harane N, Smit N, Meijborg V, Nematalla H, Périer MC, Renault M, Colas A, Hagège A, Coronel R, Mercola M, Silvestre JS, Philippe Menasché P, **Renault N**. Extracellular vesicles as effective substitutes for cell therapy for chronic heart failure. Présentation orale. *2016 European Society of Cardiology Congress*, Rome, Italie, Août 27-31, **2016**. Young Investigator Award, Basic Science.

3. Renault N*, **Kervadec A**, Bellamy V, el Harane N, Nematalla H, Lemitre M, Dumont F, Colas A, Mercier M, Hagège A, Mercola M, J Silvestre JS, Menasché P. Human iPS-derived cardiac progenitors secrete cardioprotective extracellular vesicles. Présentation orale. *International Society of Extracellular Vesicles Annual Meeting*, Rotterdam, Pays-Bas. Mai 4-7, **2016**.

2. Bellamy V, Vanneau V, Bel A, Nemetalla H, Emmanuelle Boitard S, Farouz Y, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* 2014. doi:10.1016/j.healun.2014.10.008. Présentation d'un poster. *American Heart Association Scientific Sessions 2014*, Chicago, IL, USA. Nov 15-19, **2014**.

1. Renault N*, **Kervadec A**, Toeg H, Loyer X, Nemetalla H, Arakélian L, Périer MC, Bellamy V, EL Harane N, Vanneau V, Larghero J, Hagège A, Ruel M, Boulanger C, Silvestre JS, Menasché P. Can the functional benefits of cardiac progenitor cells be equalled by their secreted extracellular vesicles? Présentation Orale. *American Heart Association Scientific Sessions 2014*, Chicago, IL, USA. Nov 15-19, **2014**.

- Présentations nationales (*Orateur)

7. **Kervadec A***. Therapeutic effectiveness of extracellular vesicles from multiple cell sources. Présentation orale. *Séminaire annuel du PARCC Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire*, Sologne. Mai 29-31, **2017**.

6. **Kervadec A***, El Harane N*, Bellamy V, Pidial L, Nemetalla H, Perier MC, Lima Correa B, Thiebault L, Smit N, Meijborg V, Cagnard N, Brunaud C, Lemitre M, Gauthier J, Tan Bourdillon A, Renault M, Hovhannisyann Y, Colas A, Hagège A, Coronel R, Mercola M, Agbulut O, Silvestre JS, Menasché P, Renault N. Extracellular vesicles secreted by human iPS-derived cardiac progenitors are an effective alternative to cell transplantation for chronic heart failure. Présentation orale. *LabEx Revive Consortium Meeting*, Paris. Jan 23-25, **2017**.

5. **Kervadec A***. Effets bénéfiques des vésicules extracellulaires de progéniteurs cardiovasculaires dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique. Présentation orale. *Journée de Recherche PARCC-HEGP*, Paris. Oct 19, **2016**.

4. **Kervadec A***, Bellamy V, El Harane N, Nemetalla H, Périer MC, Yu M, Colas A, Lemitre M, Hagège A, Mercola M, Silvestre JS, Menasché P, Renault N. Extracellular vesicles secreted by human iPS-derived progenitors improve cardiac function in a mouse model of chronic heart failure. Présentation orale. *LabEx Revive Consortium Meeting*, Paris. Fév 2-4, **2016**.

3. **Kervadec A***, Bellamy V, El Harane N, Arakélian L, Vanneaux V, Cacciapuoti I, Nemetalla H, Périer MC, Toeg H, Lemitre M, Yin M, Loyer X, Larghero J, Hagège A, Ruel M, Boulanger C, Silvestre JS, Menasché P, Renault N. Can the Functional Benefits of Cardiac Progenitor Cells be Equaled by their Secreted Extracellular Vesicles? Présentation orale. *LabEx Revive Consortium Meeting*, Paris. Jan 26-28, **2015**.

2. **Kervadec A***. Can the Functional Benefits of Cardiac Cells be Equaled by their Secreted Extracellular Vesicles? Présentation orale. *Séminaire annuel du PARCC Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire*, Normandie. Mai 18-20, **2015**.

1. Bellamy V, Vanneaux V, Bel A, Nemetalla H, Emmanuelle Boitard S, Farouz Y, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* 2014. doi:10.1016/j.healun.2014.10.008. Présentation d'un poster. *ITMO Pathophysiology Metabolism Nutrition Summer School*, Paris. Mars 15-19, **2015**.

Annexe 1 :

Analyses histologiques et immuno-histochimiques

Coloration à l'hématoxyline/éosine :

Cette coloration permet d'évaluer l'étendue de l'infarctus en marquant le cytoplasme des cellules en rose par l'éosine et les noyaux en violet par l'hématoxyline. Après décongélation, les coupes sont fixées dans l'acétone pendant 10 minutes. Elles sont lavées pendant 5 minutes dans du PBS, 5 minutes à l'eau du robinet puis plongées 2 secondes dans l'hématoxyline (Mayer, Fluka). L'excès de colorant est retiré par plusieurs rinçages à l'eau du robinet. Les lames sont ensuite immergées dans l'éosine à 1% (Eosine Y disodique, de Fluka) pendant 1 minute puis plusieurs lavages à l'eau sont réalisés qui permettent de retirer l'excès de colorant. Enfin, un montage au glycérol gélatiné entre lame et lamelle est réalisé : après avoir liquéfié le glycérol par chauffage au bain-marie pendant 10 minutes, une goutte est déposée sur la lame et la lamelle est déposée, en prenant soin de bien étaler le glycérol sur l'ensemble de la lame et de ne pas faire de bulles.

Coloration au rouge Sirius :

Le colorant rouge Sirius marque les fibres de collagène en rouge et témoigne donc de l'intensité de la fibrose provoquée par l'IDM. Les lames sont tout d'abord fixées au formol 10% pendant 10 minutes. Elles sont ensuite lavées à l'eau du robinet puis incubées avec le Rouge Picro Sirius pendant 30 minutes. Elles sont rincées dans 3 bains d'alcool à 100% suivi de 3 bains de xylène (ou de toluène). Un montage Eukitt est réalisé entre lame et lamelle.

Marquage anti-lectine :

Ce double marquage permet de déterminer le potentiel angiogénique en marquant les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ainsi que la taille des CM. Les coupes sont décongelées et fixées pendant 10 minutes à l'acétone. Les lames sont lavées 3 fois pendant 5 minutes au PBS. L'Ac primaire, l'anti-Isolectine B4 de Griffonia Simplicifolia-FITC (L2895 Sigma Aldrich), dilué au 1/20 avec une solution de BSA à 2%, est combiné avec le WGA (WGA, Vector, réf : FL-1020, Burlingame, CA) pour déterminer la taille des CM. A partir de cette étape, le reste de la manipulation se fait à l'obscurité car cet Ac primaire est couplé au fluorochrome FITC. 90 µL d'Ac primaire sont déposés par coupe et le marquage se fait pendant 1h30 à température ambiante. Les lames sont lavées 3 fois pendant 5 minutes au PBS 1X puis marquées avec 50 µL de DAPI pendant 3 minutes. Elles sont enfin lavées 3 fois pendant 5

minutes au PBS 1X et montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage MOWIOL. Elles sont conservées à 4°C et à l'obscurité.

Marquage anti-SMA :

Ce marquage permet d'identifier les artérioles en marquant l'actine α des cellules du muscle lisse. Les coupes décongelées sont fixées pendant 10 minutes dans l'acétone puis rincées pendant 3 minutes dans du PBS 1X. Les sites non spécifiques sont saturés avec 100 μ L par coupe de sérum normal de chèvre (SNG) à 7% pendant 30 minutes à température ambiante. L'Ac primaire anti-SMA (A5228, dilution 1/400, Sigma Aldrich) est dilué dans une solution de SNG à 7% et 50 μ L sont déposés par coupe. L'incubation se fait pendant 2 heures à température ambiante en environnement humide pour éviter que celles-ci ne se dessèchent. Les lames sont rincées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS 1X. L'Ac secondaire anti-mouse FITC (Invitrogen Mouse, Alexa 488) est dilué au 1/500 dans du SNG à 7% et 50 μ L par coupe sont déposés. A partir de cette étape, la suite du marquage se fait à l'obscurité. L'incubation se fait pendant 1 heure à température ambiante. Les lames sont rincées 3 fois au PBS 1X pendant 5 minutes. Les noyaux sont marqués en déposant 50 μ L de DAPI (dilution 1/3750) par coupe pendant 3 minutes. Les lames sont de nouveau rincées 3 fois au PBS 1X et un montage au MOWIOL entre lame et lamelle est réalisé pour l'observation microscopique. Les coupes sont conservées à 4°C et à l'obscurité.

Marquage anti-lamine A/C :

Cette technique, en marquant la membrane nucléaire des cellules humaines, permet de visualiser les cellules greffées. Après décongélation, les lames sont fixées dans l'acétone pendant 10 minutes. Les sites non spécifiques sont saturés avec 100 μ L de BSA à 5% par coupe pendant 30 minutes à température ambiante. L'Ac primaire anti-lamine A/C (Novocastra, A.Menarini, 35954, Rungis, France) est dilué au 1/300 dans une solution de BSA à 2% et 90 μ L sont déposés par coupe. Les lames sont incubées 2 heures à température ambiante en environnement humide. Après 3 rinçages de 10 minutes au PBS 1X, l'Ac secondaire anti-mouse FITC (A11029_alexa 488, Life Technologies) est dilué au 1/500 dans de la BSA à 2% et 90 μ L par coupe sont ajoutés. A partir de cette étape, le reste de la manipulation se fait à l'obscurité. L'incubation se fait à température ambiante pendant 1 heure. Les lames sont ensuite rincées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS 1X. 50 μ L de DAPI par coupe sont déposés et les lames

sont incubées 3 minutes. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois pendant 5 minutes avec du PBS 1X. Un montage des lames au MOWIOL est réalisé pour l'observation au microscope. Les lames sont conservées à 4°C dans l'obscurité.

Analyse des colorations et des immunomarquages :

Les colorations sont analysées à l'aide d'un scanner de lames (service Immunologie Biologique, plateforme immunomonitoring de l'Hôpital Européen Georges Pompidou dirigée par Florence Marliot) et les immunomarquages sont observés au microscope optique Leica DM 2000. Une quantification manuelle est ensuite réalisée grâce au logiciel Metamorph®.

Annexe 2 :

ORIGINAL PRE-CLINICAL SCIENCE

Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure



Anaïs Kervadec, MSc,^{a,b} Valérie Bellamy, BSc,^{a,b} Nadia El Harane, MSc,^{a,b} Lousineh Arakélian, MSc,^{c,d} Valérie Vanneaux, PharmD, PhD,^{c,d} Isabelle Cacciapuoti, MSc,^{c,d} Hany Nemetalla, MD, PhD,^e Marie-Cécile Périer, MSc,^{a,b} Hadi D. Toeg, MD, MSc, MPH,^f Adèle Richart, PhD,^{a,b,1} Mathilde Lemitre, BSc,^{a,b} Min Yin, MD, PhD,^{a,b,g} Xavier Loyer, PhD,^{a,b} Jérôme Larghero, PhD,^{c,d,g} Albert Hagège, MD,^{a,b,e} Marc Ruel, MD, MPH, FRCSC,^f Chantal M. Boulanger, PhD,^{a,b} Jean-Sébastien Silvestre, PhD,^{a,b} Philippe Menasché, MD, PhD,^{a,b,h} and Nisa K.E. Renault, PhD^{a,b}

From the ^aINSERM U970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire, Paris, France; ^bUniversité Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S970, Paris, France; ^cCell Therapy Unit, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ^dINSERM, CIC de Biothérapies (CBT-501) and U1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ^eAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiology, Paris, France; ^fDivision of Cardiac Surgery, University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario, Canada; ^gUniversity Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; and the ^hAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiovascular Surgery, Paris, France.

KEYWORDS:

extracellular vesicles;
microparticles;
exosomes;
heart failure;
cell therapy;
embryonic stem cells;
cardiovascular progenitor cells

BACKGROUND: Cell-based therapies are being explored as a therapeutic option for patients with chronic heart failure following myocardial infarction. Extracellular vesicles (EV), including exosomes and microparticles, secreted by transplanted cells may orchestrate their paracrine therapeutic effects. We assessed whether post-infarction administration of EV released by human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors (hESC-Pg) can provide equivalent benefits to administered hESC-Pg and whether hESC-Pg and EV treatments activate similar endogenous pathways.

METHODS: Mice underwent surgical occlusion of their left coronary arteries. After 2–3 weeks, 95 mice included in the study were treated with hESC-Pg, EV, or Minimal Essential Medium Alpha Medium (alpha-MEM; vehicle control) delivered by percutaneous injections under echocardiographic guidance

¹Current affiliation Baker IDI Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia.

Reprint requests: Philippe Menasché, MD, PhD, Department of Cardiovascular Surgery, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, Paris 75015, France. Telephone: +33-1-56-09-36-22. Fax: +33-1-56-09-32-61.

E-mail address: philippe.menasche@aphp.fr

into the peri-infarct myocardium. functional and histologic end-points were blindly assessed 6 weeks later, and hearts were processed for gene profiling. Genes differentially expressed between control hearts and hESC-Pg-treated and EV-treated hearts were clustered into functionally relevant pathways.

RESULTS: At 6 weeks after hESC-Pg administration, treated mice had significantly reduced left ventricular end-systolic ($-4.20 \pm 0.96 \mu\text{l}$ or -7.5% , $p = 0.0007$) and end-diastolic ($-4.48 \pm 1.47 \mu\text{l}$ or -4.4% , $p = 0.009$) volumes compared with baseline values despite the absence of any transplanted hESC-Pg or human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in the treated mouse hearts. Equal benefits were seen with the injection of hESC-Pg-derived EV, whereas animals injected with alpha-MEM (vehicle control) did not improve significantly. Histologic examination suggested a slight reduction in infarct size in hESC-Pg-treated animals and EV-treated animals compared with alpha-MEM-treated control animals. In the hESC-Pg-treated and EV-treated groups, heart gene profiling identified 927 genes that were similarly upregulated compared with the control group. Among the 49 enriched pathways associated with these up-regulated genes that could be related to cardiac function or regeneration, 78% were predicted to improve cardiac function through increased cell survival and/or proliferation or DNA repair as well as pathways related to decreased fibrosis and heart failure.

CONCLUSIONS: In this post-infarct heart failure model, either hESC-Pg or their secreted EV enhance recovery of cardiac function and similarly affect cardiac gene expression patterns that could be related to this recovery. Although the mechanisms by which EV improve cardiac function remain to be determined, these results support the idea that a paracrine mechanism is sufficient to effect functional recovery in cell-based therapies for post-infarction-related chronic heart failure.

J Heart Lung Transplant 2016;35:795–807

© 2016 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Cardiovascular diseases are a major cause of death worldwide, with an estimated 7.4 million deaths from coronary artery disease in 2012.¹ Because the adult heart has a limited potential for endogenous cardiomyocyte renewal, patients with severe chronic heart failure who are refractory to conventional drug treatment may require heart transplantation or mechanical assist devices for functional recovery. The limitations of these aggressive treatments have led to the search for alternative therapies, most notably, cell therapy.² In vitro and animal studies have shown that various cell types have the potential to reverse or attenuate cardiovascular pathologies; however, the mechanisms by which transplanted cells impart their effects are not completely elucidated.

Initially, it was thought that multipotent precursor cells might directly repopulate the damaged tissue. However, the observation that grafted cells rapidly disappear from host tissues, whereas their therapeutic benefits often persist over time, suggests that factors secreted by the implanted cells may stimulate endogenous repair or regenerative mechanisms.³ It has been shown that conditioned media alone can recapitulate the therapeutic effects of the cultured cells when injected into damaged tissue.⁴ Analyses of such conditioned media suggest that the active components are extracellular vesicles (EV).⁵

EV, including exosomes, microparticles (MP), and apoptotic bodies, have been detected in all biologic fluids and conditioned cell culture media and appear to be secreted by all cell types. These vesicles are bounded by lipid bilayer membranes and do not have nuclei. They contain messenger RNA (mRNA), microRNA, proteins, lipid rafts, and other bioactive molecules. They are coated with surface markers, some of which are specific to the vesicle sub-type. Exosomes and MP differ in their size and biogenesis; exosomes are 30 to 150 nm in size and are formed within the late endosome, whereas MP are 100 to 1,000 nm and are shed from the cell membrane. EV play an important role in paracrine signaling in physiologic and pathologic

conditions, shuttling cargo from the secreting cell to specific target cells where they are actively internalized.⁶ Target specificity and vesicle internalization may be largely mediated through the recognition of vesicle surface markers. For example, when mantle cell lymphoma-derived exosomes were incubated with peripheral blood mononuclear cells, exosomes were internalized preferentially by B lymphocytes as opposed to T lymphocytes or natural killer cells ($\sim 50\%$ of B cells vs 5% of T cells and 8% of natural killer cells).⁷ Likewise, connexin 43-positive rat cardiomyocyte-derived exosomes are preferentially internalized by connexin 43-positive over connexin 43-negative HEK-293 cells.⁸ They can directly affect gene expression (e.g., through the delivery of RNA) and can activate intracellular signaling pathways that are instrumental in the control of neovascularization, cell proliferation, apoptosis, and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. From a clinical perspective, EV are being developed as biomarkers of physiologic and pathologic states and as a therapeutic modality.^{9,10} Extracellular vesicle therapy has now been shown to be associated with improved post-ischemic recovery in various tissue types, including the heart.^{11,12}

Our laboratory has been interested in developing cell therapies for chronic heart failure, more specifically, therapies based on cells committed to the cardiovascular lineage. We have developed a clinical-grade protocol for the culture and specification of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells (hESC-Pg), which have been shown to be safe and effective in the treatment of chronic heart failure in animal models^{13–15} and are currently being evaluated in our ongoing phase I clinical trial.¹⁶ Consistent with other reports,¹⁷ we have found that the functional benefits of hESC-Pg are maintained over time despite a rapid loss of the transplanted cells.¹⁵ This discrepancy supports the hypothesis that hESC-Pg may impart their benefits via a paracrine mechanism. Given the

role of EV as mediators of paracrine signaling, the present study was designed to compare the therapeutic benefits of hESC-Pg with the sole administration of their secreted EV in a mouse model of chronic heart failure. To our knowledge, this is the first direct comparison of EV and their parent cells in this setting.

Methods

Animals

Three series of immune-deficient nude mice (Rj/NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were used in this study. All procedures were approved by our institutional ethics committee (project no. 14-063) and complied with European legislation (European Commission Directive 86/609/EEC) on animal care. All animals received humane care in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (Publication No. 86-23, revised 1996).

Mouse model of chronic cardiac insufficiency

A myocardial infarction (MI) was induced in 8-week-old male nude mice by permanent ligation of the anterior coronary artery.¹⁸ Briefly, mice anesthetized with ketamine and xylazine (110 mg/kg ketamine [Imalgene 1000; Merial, Lyon, France]; 11 mg/kg xylazine [Rompun 2%; Bayer AG, Leverkusen, Germany]) were intubated and maintained under mechanical ventilation. The left anterior descending coronary artery was exposed through a left thoracotomy and permanently ligated by a non-absorbable 7-0 suture (Péters Surgical, Bobigny, France).

Echocardiography

Cardiac function was assessed by a cardiologist (H.N.) 20 to 23 days after MI, following sedation with isoflurane, using a Vevo 2100 Imaging System and a MS400 transducer appropriate for mouse cardiovascular imaging (18–38 MHz) (VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Canada) and analyzed using the cardiac package. Left ventricular end-diastolic volume (EDV) and end-systolic volume (ESV) were calculated on cine-loops using the 2-dimensional area-length method, allowing the calculation of left ventricular ejection fraction (EF) as $EF(\%) = [(EDV - ESV) / EDV] \times 100$. Only animals with an ejection fraction $\leq 50\%$ were included and randomly assigned to treatment or control groups. The same cardiologist, blinded to the treatment group, re-evaluated the cardiac performance 6 weeks after treatment.

Culture and purification of hESC-Pg

16 human embryonic stem cells (generously provided by J. Itskovitz and M. Amit, Technion Institute, Haifa, Israel) were expanded, cardiac-committed, and purified as previously described.¹¹ Freshly sorted hESC-Pg recovered immediately after sorting were injected immediately thereafter or plated on vitronectin-coated plates (vitronectin, truncated recombinant human (VTN-N); Life Technologies, Paisley, UK) and cultured at 37°C and 5% carbon dioxide.

Flow cytometry

The purity and viability of the final cell preparation used for injections was assessed using the monoclonal antibody SSEA-1-fluorescein isothiocyanate and matched isotype controls (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France) and the vital dye 7-aminoactinomycin D (7AAD; Beckman Coulter, Villepinte, France), respectively. Data were acquired and analyzed on a 5-parameter flow cytometer (BD FACSCalibur; Becton Dickinson) with BD CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

RNA extraction and reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total cellular RNA from hESC-Pg was extracted using an RNeasy kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) and quantified by Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Quantitative polymerase chain reaction primer sequences are detailed in the supplementary data (available in the online version of this article at www.jhltonline.org).

Immunofluorescent analysis of hESC-Pg

Freshly sorted hESC-Pg and hESC-Pg recovered after 48 hours of culture on vitronectin were cytospun (100,000 cells per spot, 300g, 5 minutes) and fixed in paraformaldehyde 4%. Apoptosis was assessed by anti-activated Caspase 3 immunofluorescence staining (Anti-active Caspase-3 antibody; Abcam, Cambridge, UK). Cell differentiation state was assessed by 2 cardiovascular markers (Anti-Islet 1 antibody – Neural Stem Cell Marker and Anti-MEF2C antibody; Abcam) and one neuronal marker (Anti-Nestin antibody [10C2]; Abcam).

EV isolation and characterization

To isolate EV, conditioned media were centrifuged to remove cells and debris. The supernatant was ultracentrifuged at 99,855g (average relative centrifugal field) (37,500 rpm, Rotor 60Ti; Beckman Optima Ultracentrifuge LE-80K; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, CA) with maximum acceleration and deceleration for 16 hours at 4°C. The pellet was resuspended in 0.1 µm–filtered Minimal Essential Medium Alpha Medium (alpha-MEM; MEM alpha Medium [1X]; Life Technologies). Extracellular vesicle concentrations and size distributions were determined by dynamic light scattering (NanoSight LM-14, Malvern, Malvern, UK) and nanoparticle tracking analysis (NTA 3.0, Malvern), where particles < 150 nm were considered to be exosomes and particles between 150 and 1000 nm were considered to be MP. Data were validated by qNano analysis (Izon Science, Oxford, UK) using nanopore Np100 (Izon Science). Exosomes were further characterized by enzyme-linked immunosorbent assay using CD9 ExoELISA kit (System Biosciences, Mountain View, CA) and by cryogenic transmission electron microscopy (see supplementary data, available in the online version of this article at www.jhltonline.org).

Fluorescent tracking of EV in vivo

EV were fluorescently labeled for visualization by red fluorescence (DiD) labeling.¹⁹ Briefly, the dye delivery solution (Vybrant DiD cell-labeling solution; Life Technologies, Eugene, OR) was added to conditioned media to a final concentration of 1 µmol/liter and immediately ultracentrifuged for 1.5 hours at 99,855g

(average relative centrifugal field), washed 2 times in phosphate-buffered saline, resuspended in 10% dimethyl sulfoxide and phosphate-buffered saline, and frozen. Vesicles were injected and visualized *ex vivo* using a Photon Imager RT (Biospace Lab, Nesles la Vallée, France).

Transcutaneous echocardiography-guided intramyocardial injections

To avoid reoperating on mice with chronic heart failure and the associated high mortality rate, closed-chest, transcutaneous, echocardiography-guided injections were used to deliver treatments or control solution.²⁰ Briefly, animals were anesthetized with isoflurane and fixed in a supine position on a heating pad. The infarcted region was located by echocardiography. A micro-manipulator (VisualSonics, Inc.) was used to guide a 1.5-inch-long, 27-gauge needle (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France), which delivered 3 10- μ l injections into the peri-infarcted myocardium. The accuracy of this mode of delivery was validated by the injection of vesicles previously labeled with a fluorescent dye (DiD) into the heart of a mouse with chronic heart failure. A fluorescent signal was observed at the site of injection in the peri-infarcted zone by fluorescence imaging 24 hours after injection (Figure S1, available in the online version of this article at www.jhltonline.org), confirming that at least some of the vesicles were delivered to the infarct site.

Experimental Series

This study consists of 4 experimental series (Figure 1). Mice involved in *in vivo* experiments were distributed among 3 experimental series that primarily differed by the modalities of cell processing (i.e., use of freshly sorted hESC-Pg or of hESC-Pg cultured on vitronectin for 48 hours before injection) and the type of analyses at the end of the experiment (cardiac functional analyses, histologic examination, gene expression analyses).

The objective of series 1 was primarily to validate the therapeutic competency of hESC-Pg at the completion of the differentiation and/or sorting procedure. To this end, hearts received either 500,000 freshly sorted hESC-Pg or alpha-MEM control. Mice in this series were evaluated by echocardiography (hESC-Pg freshly sorted, $n = 12$; alpha-MEM controls, $n = 18$).

Series 2 was poised for the head-to-head comparison of mice treated with vitronectin-cultured hESC-Pg (500,000 cells), EV derived from the same batch of cells, and alpha-MEM controls. Mice were evaluated for cardiac function by echocardiography (hESC-Pg, $n = 15$; EV, $n = 16$; alpha-MEM controls, $n = 14$). Selected hearts from series 2 were used for histologic analyses (5 animals from each treatment group and the control group with comparable baseline left ventricular ESV), gene profiling analysis (1 control heart, 2 hESC-Pg-treated hearts, and 2 EV-treated hearts), and search for transplanted cells at the end of the study period (10 animals with hESC-Pg injected, 1 animal with EV injected, and 1 animal with alpha-MEM injected).

In series 3 (in which mice received 300,000 cells or the EV secreted by the same amount of cells), explanted hearts (1 alpha-MEM control heart, 1 sham-operated control heart, 1 hESC-Pg-treated heart, and 1 EV-treated heart) were exclusively used for gene profiling studies. For this series, hESC-Pg at the end of the cell sorting were split into 2 fractions: 1 fraction for immediate

injection (freshly sorted) and 1 fraction to be plated on vitronectin-coated plates for the generation of hESC-Pg-derived EV.

Experimental series 4 consisted exclusively of *in vitro* characterization of EV secreted by hESC-Pg cultured on vitronectin-coated plates. Specifically, vesicle number and size distribution were determined by NanoSight or qNano, and vesicle morphology was determined by cryogenic transmission electron microscopy analyses, as described earlier under EV isolation and characterization.

Tissue harvesting

At the end of the experiments, mice were anesthetized by ketamine and xylazine as described earlier, and hearts were harvested and rinsed in normal saline solution. The basal section of the heart was removed at the level of the atria. Tissue fragments were placed in cryotubes for mRNA expression studies or embedded in optimal cutting temperature compound (CellPath, Newtown, UK) for histologic analysis. Samples were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Details of the histologic and immunohistochemical analyses are given in the supplementary data (available in the online version of this article at www.jhltonline.org).

Gene expression analysis

Animals with similar baseline left ventricular ESV from each treatment group were selected for gene expression analyses (supplementary data, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). Data were robust multi-array average normalized.²¹ Data quality was assessed by unsupervised principal component analysis and analysis of variance applied to find differentially expressed genes using Partek Genomics Suite (Partek, Inc., St. Louis, MO). Enrichment analyses were carried out using Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Redwood City, California). All data obtained by microarray analysis have been submitted to, and validated by, the Gene Expression Omnibus site (accession number GSE69401).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed by an independent statistician (M.-C.P.), blinded to the treatment group. Values are given as means \pm SEM. Paired parametric Student's *t*-tests were used to compare echocardiographic functional changes before and after treatment. Echocardiographic and histologic data were compared between groups by analysis of variance with Tukey adjustment for multiple comparisons. For all analyses, a 2-tailed *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. Analyses were conducted using SAS 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Results

Characterization of cells

To prepare hESC-Pg for the four experimental series, 8 separate specification and cell sorting procedures were performed (Figure 1). Progenitor cell preparations were consistently pure (mean \pm SEM, $88.8 \pm 3\%$) and viable ($96.0 \pm 1\%$) immediately after cell sorting. Based on quantitative polymerase chain reaction analyses, the pluripotency markers *NANOG* and *SOX2* were downregulated,

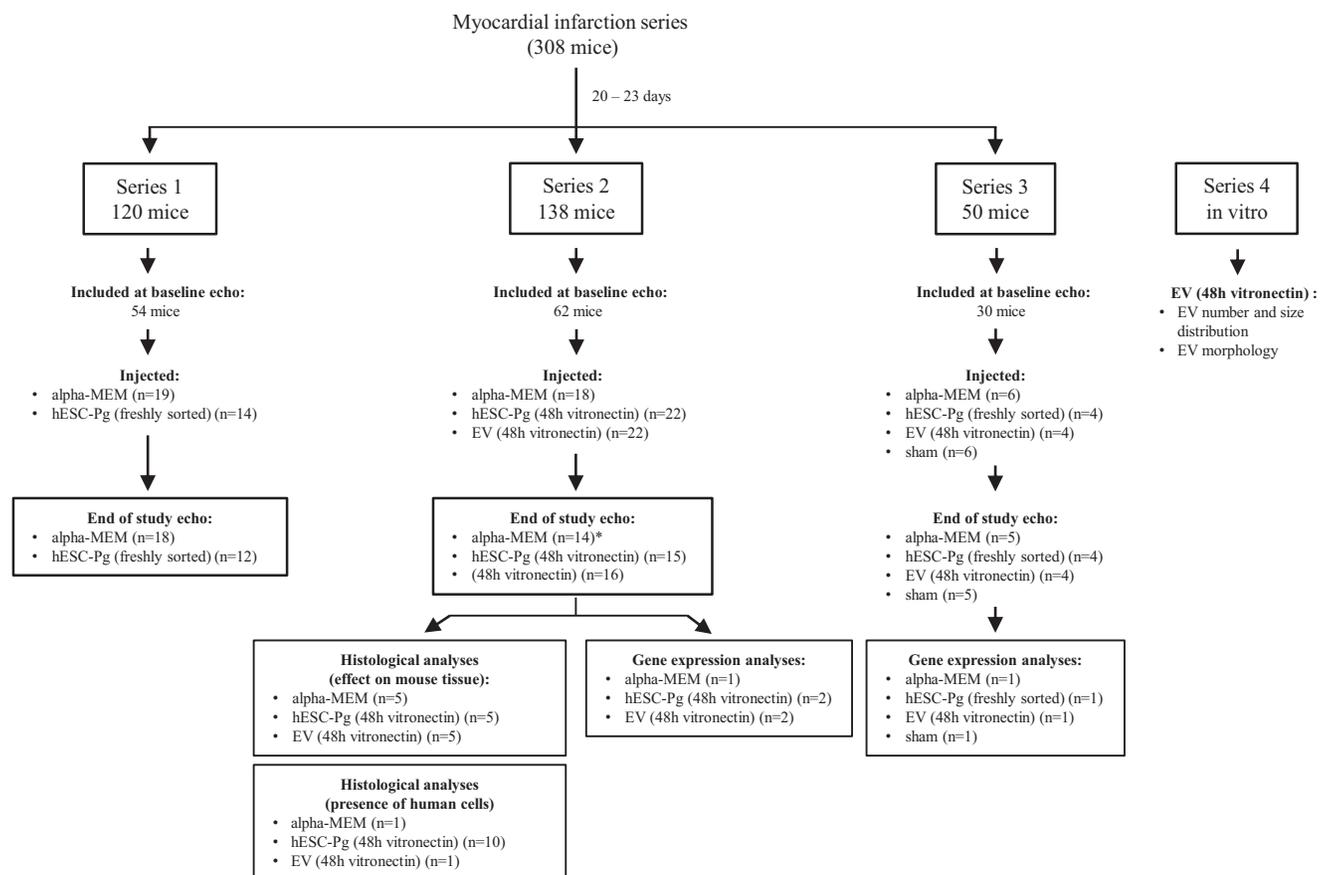


Figure 1 Study design. Four series of experiments were completed for this study. Series 1 to 3 were targeted for in vivo evaluation of the therapeutic efficacy of hESC-Pg and their secreted EV, and series 4 was exclusively targeted for the characterization of EV. For series 1 to 3, a MI was induced in nude mice by permanent occlusion of the coronary artery. Mice in chronic heart failure were randomly allocated to treatment and control groups 3 weeks later (20–23 days). In series 1, the therapeutic competency of hESC-Pg (500,000 cells) at the completion of the differentiation and sorting procedure was compared with alpha-MEM controls by echocardiography (hESC-Pg freshly sorted, $n = 12$; alpha-MEM controls, $n = 18$). In series 2, the therapeutic efficacy of vitronectin-cultured hESC-Pg (500,000 cells), EV derived from the same batch of cells, and alpha-MEM controls were evaluated principally by echocardiography (hESC-Pg, $n = 15$; EV, $n = 16$; alpha-MEM controls, $n = 14$). Selected hearts from series 2 were also used for histologic analyses (5 animals from each treatment group and the control group with comparable baseline left ventricular ESV), gene profiling analysis (1 control heart, 2 hESC-Pg–treated hearts, and 2 EV-treated hearts) and to determine if transplanted cells persisted to the end of the study period (10 animals with hESC-Pg injected, 1 animal with EV injected, and 1 animal with alpha-MEM injected). In series 3 (in which mice received 300,000 cells or the EV secreted by the same amount of cells), explanted hearts (1 alpha-MEM control heart, 1 sham-operated control heart, 1 hESC-Pg–treated heart, and 1 EV-treated heart) were exclusively used for gene profiling studies. For this series, hESC-Pg at the end of the cell sorting were split into 2 fractions: 1 fraction for immediate injection (freshly sorted) and 1 fraction to be plated on vitronectin-coated plates for the generation of hESC-Pg–derived EV. Experimental series 4 consisted of the in vitro characterization of EV secreted by hESC-Pg cultured on vitronectin-coated plates, including NanoSight, qNano, and cryogenic transmission electron microscopy analyses. n , number of mice at each stage of the experiment. *The number of animals analyzed after the removal of 2 outliers.

and the early cardiovascular markers *ISL-1*, *MEF2C*, and *TBX5* were upregulated, albeit to varying degrees, compared with *I6* human embryonic stem cells. In only 1 of the 8 preparations was *SOX2* expression upregulated to a greater extent than expected, possibly as a result of contaminating cells committed to a neural lineage, as suggested in this case by increased expression of *NES*.

The culture of hESC-Pg on vitronectin maintained their phenotype, as shown by the persisting expression of cardiac markers over the 48 hours of culture (Figure 2B, C, E, F), but induced an increase in apoptotic markers (Figure 2A, D) and a decrease in viability (Table S1, available in the online version of this article at www.jhltonline.org).

Characterization of exosomes and MP

After 48 hours of hESC-Pg culture on vitronectin, the conditioned media were collected, and total EV were prepared by ultracentrifugation. According to NanoSight analysis, the concentrations of total EV were similar among preparations with a yield of approximately 1,300 particles per cell (Table S2, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). The relative abundance of exosomes and MP was also consistent, with an average of 43% of particles of the size of exosomes that equated to a recovery of 575 exosomes per secreting cell. In experimental series 4, the EV concentration was confirmed by qNano

hESC-Pg cytopspins (series 4)

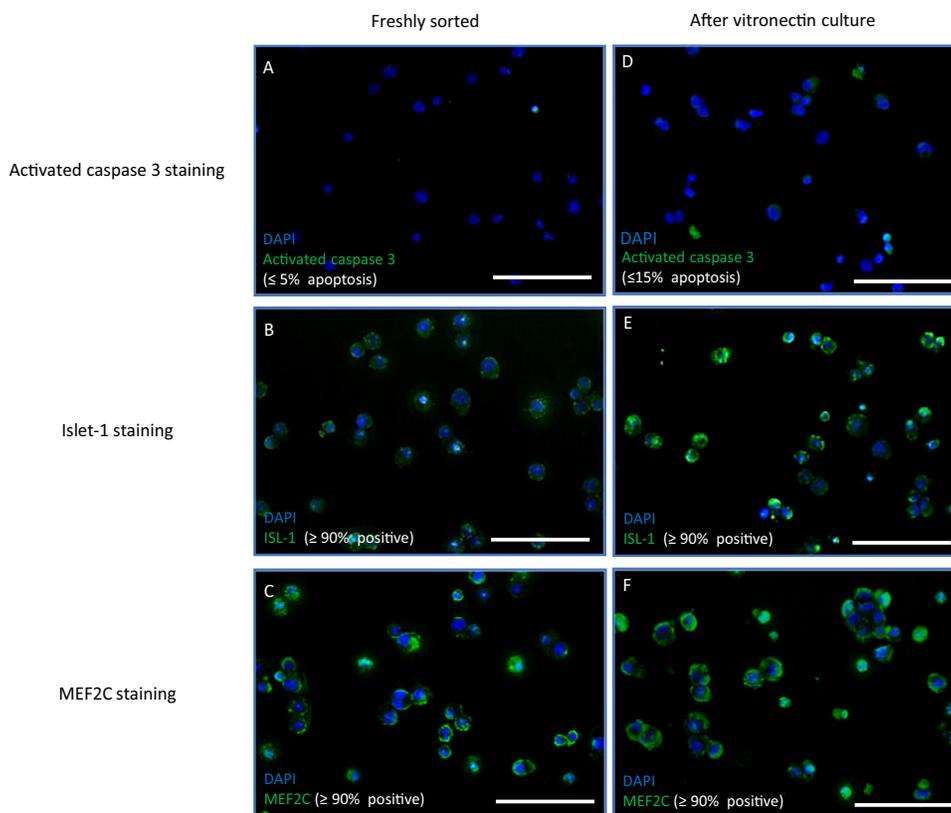


Figure 2 Cellular identity of hESC-Pg is maintained over 48 hours of culture on vitronectin, whereas the percentage of apoptotic cells increases. Immediately following magnetic cell sorting 4 (A–C) or after 48 hours of culture on vitronectin (D–F), cells were centrifuged onto glass slides, fixed, and analyzed by immunofluorescent staining (4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]) for the presence of early cardiovascular markers ISL-1 (A) and MEF2C (B) and activated caspase-3 (C), a marker of apoptosis. At both time points, cells express the same level of early cardiovascular markers, indicating that their cellular identity is preserved over the culture period. Apoptosis is increased in hESC-Pg after culture on vitronectin, confirming that vitronectin culture conditions are stressful to these cells. Bar = 100 μ m.

analysis. Particle size distribution curves were also highly similar between the 2 analysis methods (Figure 3A, B), with the exception of a slight shift of the curve toward smaller sizes in the qNano analysis as a result of the differences in

technology. An analysis of nano-pore blockade vs size indicated that most of the detected particles were of similar shape, with only a small percentage of a shape/size ratio indicative of fused particles ($\sim 3\%$) (Figure 3C), suggesting

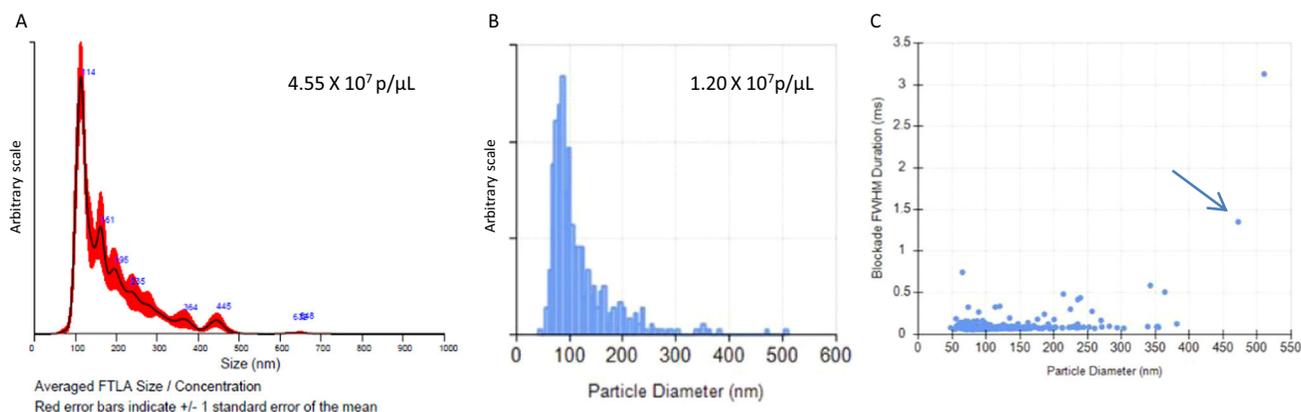


Figure 3 NanoSight and qNano analyses identify particles in the size range of exosomes (50–150 nm) and MP (150–500 nm). The concentrations of total EV and particle size distributions for EV preparations from each series were determined by NanoSight. These were found to be highly consistent between experiments (data not shown). The EV from series 4 were analyzed by NanoSight (A) and by qNano (B, C). The same size distribution curves were found by these 2 technologies, with the qNano curve being slightly shifted to smaller sizes as expected. Pore blockade analysis by qNano (C) identified the presence of a few non-spherical particles (arrow) indicative of ≥ 2 particles fused together. FTLA, finite track length adjustment.

that ultracentrifugation-induced particle fusion was minimal. The exosome-specific surface marker CD9 was detected in total EV preparations by enzyme-linked immunosorbent assay with an approximate yield of 1,977 exosomes per cell. This was a higher estimated yield of exosomes per cell than detected by NanoSight and qNano, possibly because of the inability of these machines to quantify particles trapped in large clumps that were not fully resuspended after ultracentrifugation. Flow cytometry confirmed the presence of Annexin V-positive particles (Annexin V-FITC, Roche Diagnostics, Meylan, France) in the size range of MP detectable by this method (>300 nm) with a similar level of MP in each preparation (data not shown). Cryogenic transmission electron microscopy analysis of EV preparations also confirmed the presence of vesicles of the size of exosomes and MP and multivesicular bodies of the size of apoptotic bodies (Figure 4). To ensure that our results would not be biased by the presence of particles originating from the culture media, our $0.2\ \mu\text{m}$ -filtered alpha-MEM + B27 medium was subjected to 16 hours of ultracentrifugation (37,500 rpm). No pellet was observed. The bottom of the tube was thoroughly rinsed with a minimal volume of $0.1\ \mu\text{m}$ -filtered phosphate-buffered saline, and the suspension was observed by NanoSight. Although several particles were visible on the screen, the level was well below the quantifiable minimum, suggesting that if polluting particles were present in the media, they were unlikely to affect our results.

Cardiac functional data

For series 1, MI was induced in 120 mice. Among these, 54 survived the procedure and met the pre-set cut-off inclusion criterion of $\text{EF} < 50\%$; 33 mice were randomly assigned to receive freshly sorted hESC-Pg or alpha-MEM. At the 6-week post-procedure study point, the surviving hESC-Pg-treated hearts ($n = 12$) demonstrated a significant decrease in left ventricular ESVs and left ventricular EDVs, whereas

alpha-MEM control hearts ($n = 18$) did not improve significantly over the study period, confirming the therapeutic efficacy of the hESC-Pg prepared under our current protocol (Figure 5).

In series 2, MI was induced in 138 mice and the 62 surviving mice meeting the inclusion criteria were randomly assigned to receive vitronectin-cultured hESC-Pg, EV derived from the same batch of cells, or alpha-MEM (control group). There were only 2 animals with severe heart failure (both in the alpha-MEM vehicle control group) whose baseline cardiac functional values fell outside the accepted baseline range (2 SDs from the mean) and consequently were removed from the study. At the end of the study period (39–43 days after injections), all remaining animals (hESC-Pg, $n = 15$; EV, $n = 16$; alpha-MEM, $n = 14$) were assessed by echocardiography. At this 6-week time point, left ventricular ESVs (mean \pm SEM) did not significantly differ from the pre-injection values in control hearts (difference $-2.64 \pm 1.54\ \mu\text{l}$, $p = 0.12$, which is equivalent to -4.1% of baseline) (Figure 6). Conversely, in the hESC-Pg-treated group, left ventricular ESVs significantly decreased by $4.20 \pm 0.96\ \mu\text{l}$ ($p = 0.0007$, -7.5% of baseline). A similar decrease in volumes was seen in the EV-treated group: $5.73 \pm 1.21\ \mu\text{l}$ ($p = 0.0003$; -9.2% of baseline). Similar patterns of changes were seen for left ventricular EDVs, which decreased significantly in the hESC-Pg group (by $4.48 \pm 1.47\ \mu\text{l}$, $p = 0.009$, -4.4% of baseline) and the EV group (by $4.29 \pm 1.31\ \mu\text{l}$, $p = 0.005$, -4.4% of baseline), whereas the decrease was only $2.46 \pm 1.19\ \mu\text{l}$ in the control group ($p =$ not significant, -3.0% of baseline). EF improved significantly in all groups, with the greatest improvement found in EV-treated animals ($+8.1\%$ improvement over baseline). No global intergroup comparison reached statistical significance for any of the functional parameters examined (EF, left ventricular ESV, left ventricular EDV). The improvements found in mice treated with the vitronectin-cultured hESC-Pg (series 2) were not significantly different from the improvements in mice treated with their freshly sorted counterparts in series 1 (Figure 5). The small

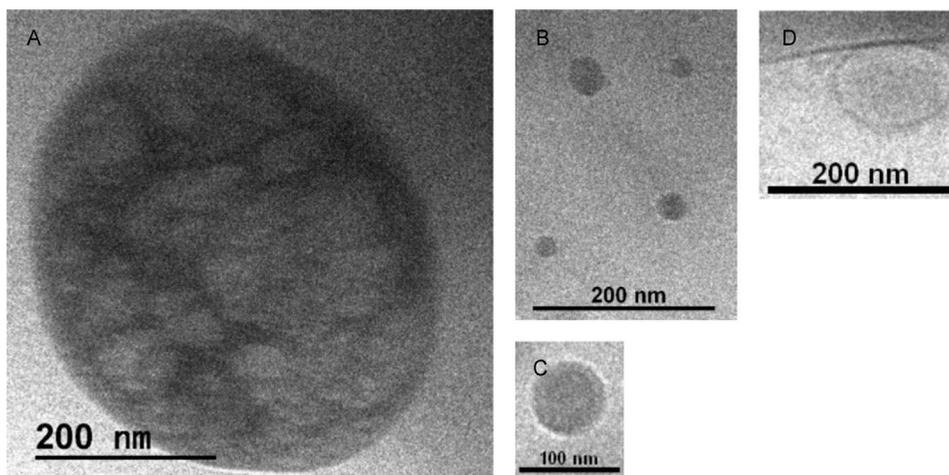


Figure 4 Cryogenic transmission electron microscopy identifies vesicles the size of exosomes, MP, and apoptotic bodies. Cryogenic transmission electron microscopy analysis of total EV preparations from sort 2c (for experimental series 2) and sort 4 confirmed the presence of vesicles the size of exosomes (B, C) and MP (D). Several large multivesicular bodies were also identified, which may correspond to apoptotic bodies (A).

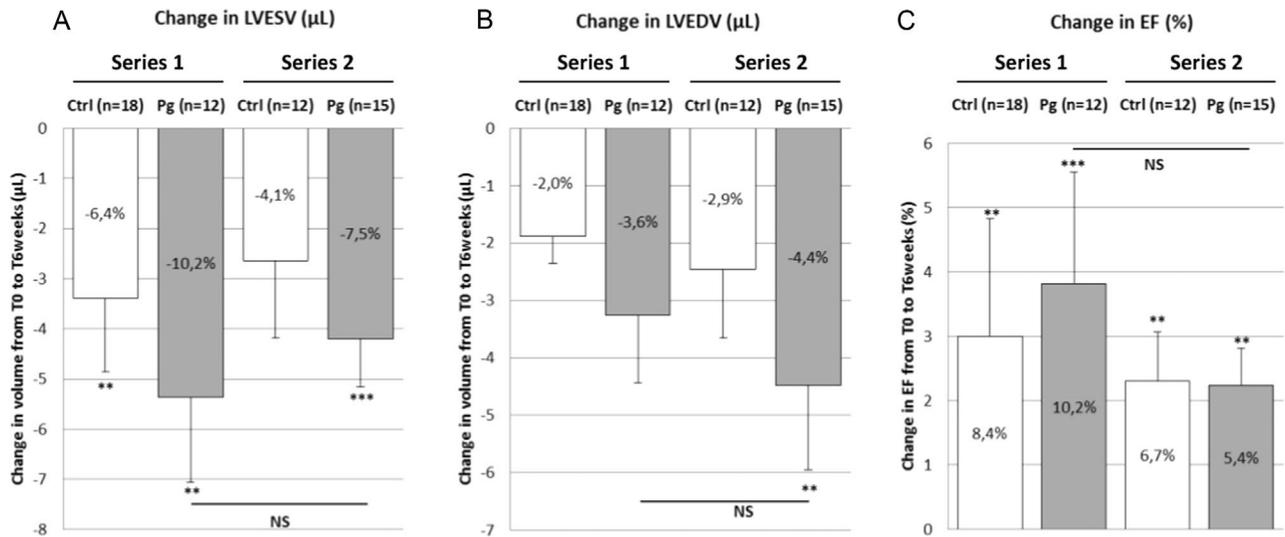


Figure 5 Mice treated with freshly sorted hESC-Pg or stressed hESC-Pg have similarly and significantly improved cardiac function. Mice with chronic heart failure were treated with hESC-Pg immediately following their purification by magnetic cell sorting (series 1) or after 48 hours of stressful culture conditions (series 2). Mice treated with freshly sorted hESC-Pg and mice treated with hESC-Pg cultured on vitronectin had equivalent and significantly reduced cardiac volumes and increased EF versus baseline. Labels indicate the change as a percentage of the baseline value. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; NS, not significant. Ctrl, alpha-MEM controls (white bars); Pg, human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors (gray bars); LVESV, left ventricular end-systolic volume; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume.

improvement in EF among control mice can likely be attributed to the natural evolution of the mouse in chronic heart failure leading to a slight hyper-contractility of the posterior wall to compensate for the akinesia of the anterior infarcted wall or possibly a restricted potential for innate recovery of the infarcted or peri-infarcted myocardium in this experimental setting.

Histologic data

For histologic analyses, 5 mice of each group were selected for their strictly comparable baseline left ventricular ES.

There was a trend for hESC-Pg-treated animals to have slightly smaller infarcts than control animals (Figure S2, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). Both hESC-Pg-treated and EV-treated mice had less total fibrosis and smaller cardiomyocytes than control mice, although these differences were not significant. No differences were observed in the degree of fibrosis within the healthy myocardium or in the number of arterioles in the peri-infarcted myocardium. Mice receiving EV had significantly more capillaries per cardiomyocyte. Even when restricting cardiac functional analyses to this

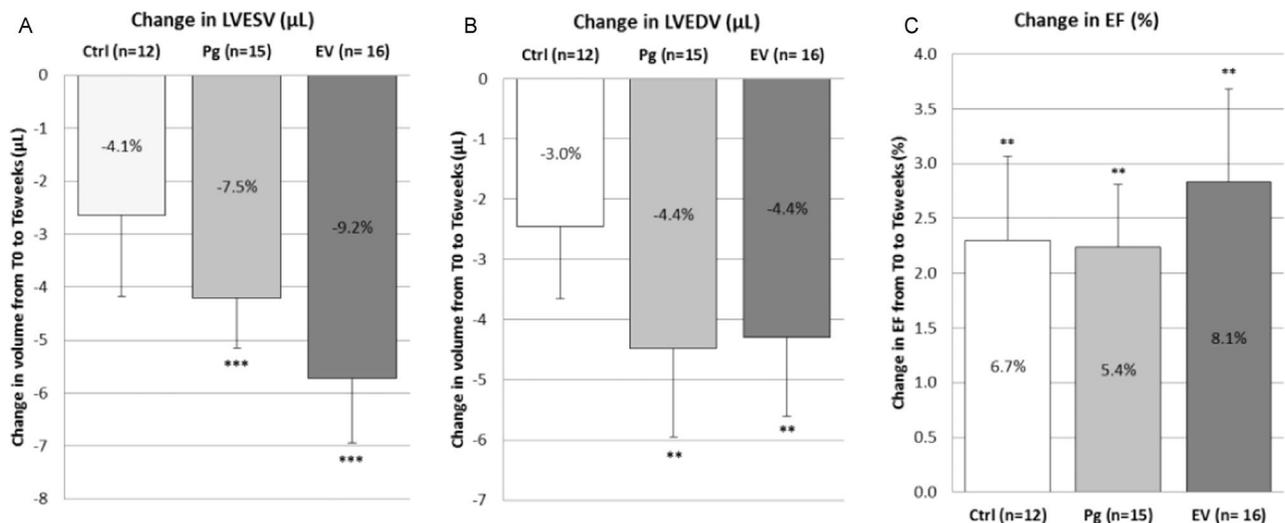


Figure 6 Mice treated with hESC-Pg and EV have similarly and significantly improved cardiac function. Mice with chronic heart failure were treated with hESC-Pg cultured 48 hours on vitronectin (hESC-Pg group), the total EV released by the same cells during those 48 hours (EV group), or alpha-MEM control (Ctrl). The evolution of cardiac functional parameters from baseline (before injection) to 6 weeks after treatment was determined. Mice in the hESC-Pg group and mice in the EV group had similarly and significantly reduced left ventricular ESVs and left ventricular EDVs, whereas the change in volumes in the controls was not significant (A, B). EF improved in all groups, with the greatest improvement in the EV group (C). Labels indicate the change as a percentage of the baseline value. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Pg, human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors; Ctrl, control; LVESV, left ventricular end-systolic volume; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume.

small sample of mice with similar baseline function ($n = 5$ per group), functional improvements were still found to be superior in hESC-Pg-treated and EV-treated animals compared with controls (Figure S3, available in the online version of this article at www.jhltonline.org).

To search for persisting human cells at the end of the study period, 10 hESC-Pg-treated mouse hearts, 1 EV-treated mouse heart, and 1 alpha-MEM control mouse heart were entirely sectioned. Sections from 24 distinct levels of the heart, ranging from apex to base, were analyzed for the presence of human cells by anti-lamin A/C (Lamin Novocastra, Leica Biosystems, Nanterre, France) immunofluorescence staining. Although positive controls of hESC-Pg-loaded fibrin patches grafted onto rat hearts showed strong nuclear lamin staining, no human cell was detected in any of the sections examined (data not shown), suggesting that the grafted cells do not persist to the 6-week post-treatment time point.

Gene expression profiling

For gene expression profiling analyses, 5 animals from series 2 with matched baseline functional parameters (2 hESC-Pg-treated mice, 2 EV-treated mice, and 1 alpha-MEM control mouse) were used. Four baseline-matched animals from series 3 were also analyzed (1 hESC-Pg-treated, 1 EV-treated, 1 alpha-MEM control, and 1

sham-operated mouse). Unsupervised principal component analysis identified 927 genes strongly correlated to the first principal component (PC1; Pearson coefficient 0.8–1.0) (Table S3, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). For these genes, all mice from series 3 had higher expression levels than mice in series 2 (Figure 7A), possibly as a result of better cardiac function at baseline. In series 2, the 927 genes were similarly upregulated in hESC-Pg-treated and EV-treated animals compared with control animals (Figure 7B). The same relationship was found in series 3 where the genes were also similarly upregulated in hESC-Pg-treated and EV-treated animals compared with control animals (alpha-MEM solution and sham procedure).

Ingenuity pathway analysis identified 669 biologic processes associated with the 927 genes that were significantly enriched in our sample ($p < 0.05$). Of these processes involving 418 distinct overexpressed genes, 49 could be classified into 5 broad categories relevant to heart function or regeneration: fibrosis, heart failure (including pathways associated with MI and hypertrophy), DNA repair, cell cycle, and cell survival (Table S4, available in the online version of this article at www.jhltonline.org). A z-score analysis was used to determine if each relevant pathway was predicted to be upregulated or downregulated in EV-treated animals compared with control animals. The fold-change data for series 2 were selected to calculate this score because series 2 showed the greatest difference

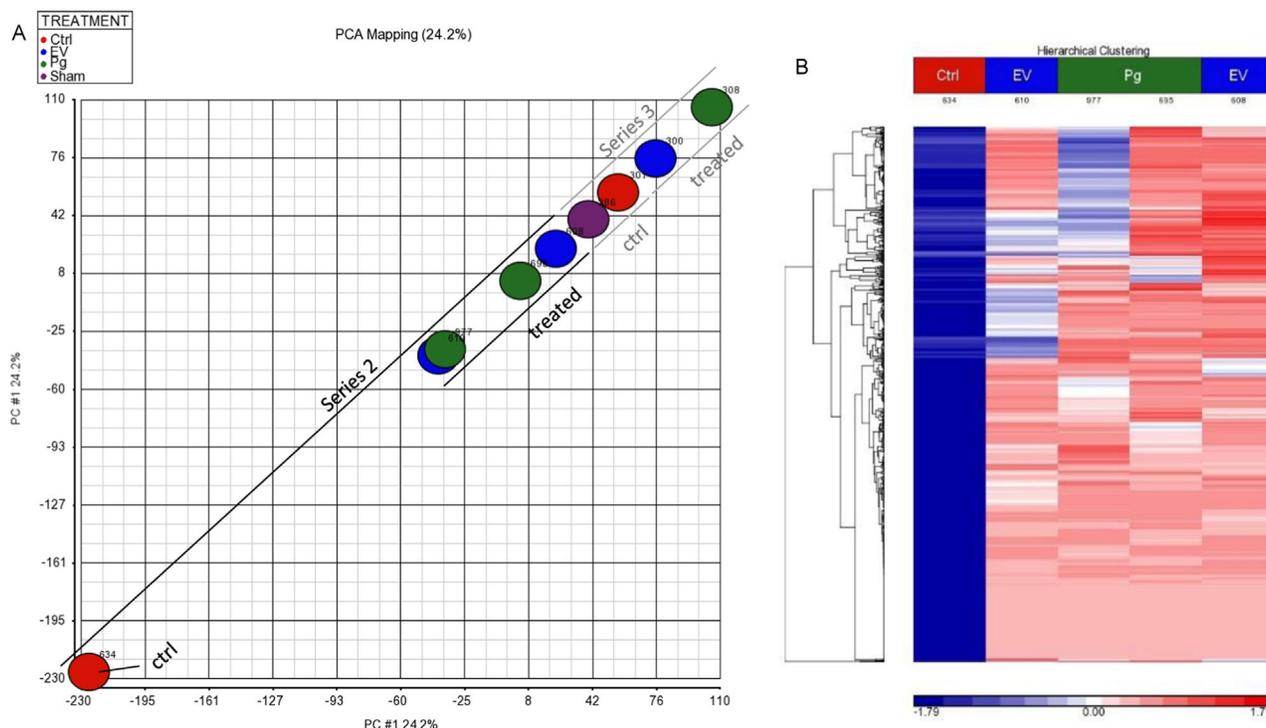


Figure 7 Differential gene expression analysis of mouse hearts 6 weeks after treatment. A set of 5 and 4 baseline left ventricular ESV-matched mice from series 2 and 3, respectively, were selected for gene expression profiling. (A) Principal component analysis revealed that genes associated with the first principal component (PC#1) were over-expressed in mice of series 3 as compared to mice of series 2. For both series, animals treated with hESC-Pg (green balls) or their EV (blue balls) had higher expression levels of these genes than controls (alpha-MEM [red balls]; or the sham operated control [purple ball]). There were 927 genes highly correlated to the PC#1 (Pearson coefficient 0.8–1.0). (B) A heat map of these 927 genes in mice of series 2 illustrates the dramatic difference in gene expression levels between animals treated with hESC-Pg or EV and control animals.

between treated and control animals. We then manually annotated whether this would be predicted to lead to a beneficial or detrimental outcome for a heart with chronic failure. For example, the pathway “dilation of heart ventricle” was expected to be downregulated in EV-treated mice compared with controls, based on the differential expression of 6 genes; this was classified as leading to a beneficial outcome. The pathway “hypertrophy of tissue” was expected to be upregulated in EV-treated mice as opposed to control mice, based on the expression of 16 other differentially expressed genes; this was predicted to lead to a detrimental outcome. Both of these pathways were classified as being in the heart failure category. Overall, we found that the biologic pathways associated with the genes overexpressed in EV-treated mice compared with control mice were predicted to lead primarily to beneficial outcomes (78% of pathways) through increased cell survival, proliferation, and DNA repair as well as decreased fibrosis and a decreased transition to heart failure (Figure 8). Because the expression levels for the 927 enriched genes were similar between EV-treated and hESC-Pg-treated mice, the same overall beneficial outcome could also be predicted for the hESC-Pg-treated mice.

Discussion

Several studies have reported the therapeutic efficacy of cell-derived EV in experimental models of MI,¹¹ hindlimb ischemia,^{22,23} and acute renal failure.²² However, the extent to which these effects recapitulate the effects of the parent cells is still elusive. To address this issue, we performed a head-to-head comparison of hESC-Pg and EV released by the same cells in a mouse model of chronic left ventricular

dysfunction. To our knowledge, this was the first such direct comparison of EV with their secreting cells. The results point to the functional equivalence of the 2 treatment modalities.

Consistent with our previous study,¹⁵ we found no residual transplanted cells in the host myocardium 6 weeks after injections. This result is consistent with most of the published data on the progressive attrition of cellular grafts. The observation, at the same time point, of a significant improvement in contractile function and remodeling supports the concept of a paracrine effect, whereby cells release biomolecules that harness endogenous repair pathways,^{3,15} including a potential increase in cardiomyocytes derived from paracrine-stimulated endogenous stem cells or progenitor cells.^{24,25} Supporting the hypothesis that cell therapies act through paracrine effectors, several studies have found functional benefits from conditioned media or individual factors isolated from these media.⁵ However, our finding that the cell-related improvement could be duplicated by the sole delivery of their secreted vesicles lends credit to the hypothesis that the highly enriched biologic content of these vesicles is likely a key mediator of the cell-triggered paracrine signaling events.

EV as therapeutic agents

Cell-derived EV, which primarily comprise exosomes and MP, have the ability to transfer a wide array of active biomolecules, such as mRNA, microRNA, proteins, and lipids, to target cells, which makes them key players of the intercellular communication network.²⁶ The therapeutic use of EV could address the limitations of conditioned media (i.e., the presence of large molecules likely unable to

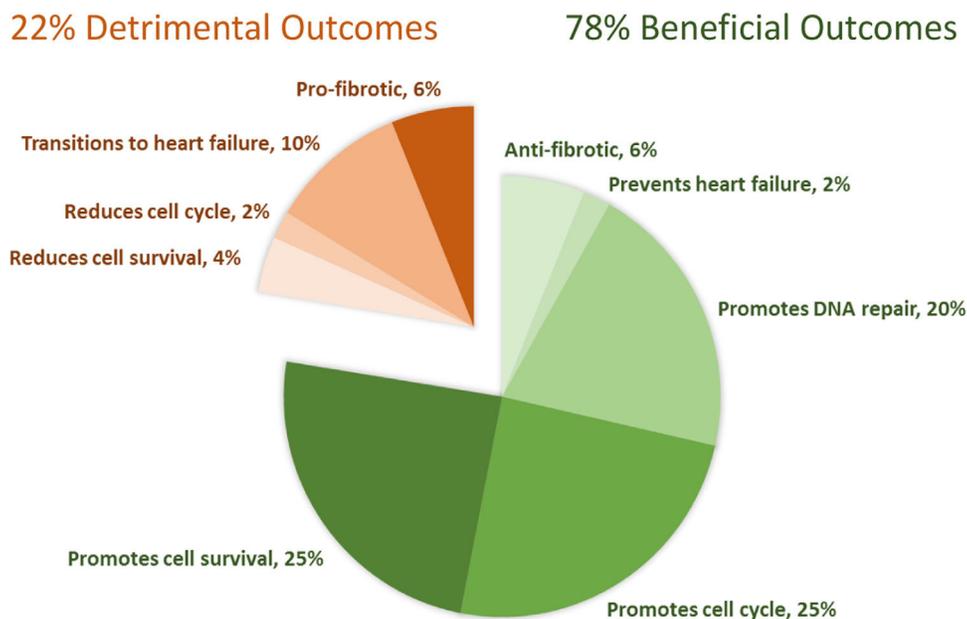


Figure 8 Most enriched pathways relevant to heart function or regeneration are predicted to lead to beneficial cardiac outcomes. Ingenuity pathway analysis of the 927 genes overexpressed in treated animals identified 669 biologic pathways that were significantly enriched. Of these, 50 could be classified as relating to heart function or regeneration. The z -score analysis predicted that these 50 pathways would predominantly lead to beneficial cardiac outcomes. This result is consistent with the hypothesis that hESC-Pg or EV treatment stimulates host gene expression, leading to improved cardiac function.

permeate cell membranes) and of isolated factors (i.e., a biologic effect restricted to a single pathway). Characterization studies have shown that the molecular content and surface markers depend on the nature of the secreting cell, which has an impact on their therapeutic potential. In line with the prevailing hypothesis that the most functionally effective stem cells for improving the function of chronically failing hearts seem to be cells committed to a cardiac lineage,^{27–30} we used hESC-Pg, prepared as for our ongoing clinical trial,¹⁶ as the reference cells and compared their effects with the effects of their secreted EV. Because stress has been reported to be a potent activator of EV release,³¹ hESC-Pg were cultured on vitronectin for 48 hours rather than on feeder cells, which are the optimal substrate for maintaining their viability. The success of this strategy was demonstrated by the high percentage of apoptotic cells at the time cultures were stopped for the isolation of EV, regardless of whether stress was due to the coating matrix, the lack of serum in the media, or the lack of factors otherwise released by feeder cells. Furthermore, although most mouse studies of stem cells are performed in an acute setting (i.e., immediately after coronary artery ligation), we selected to deliver treatments at a more chronic stage (2–3 weeks after infarction), which is more clinically relevant. Because of the high mortality rates associated with reoperations, we used minimally invasive closed-chest, echocardiography-guided injections²⁰ to perform this procedure with almost zero mortality. Separate fluorescence imaging experiments validated the accuracy of these transcutaneous peri-infarct targeted deliveries.

Interpretation of outcomes

The major finding of this study is that the functional benefits of injecting hESC-Pg with regard to limitation of adverse remodeling and improvement in pump function could be duplicated by the sole delivery of the EV derived from these cells. Left ventricular ESV, which is now recognized as one of the most reliable predictors of clinical outcomes in heart failure,³² was significantly reduced from corresponding baseline values, and to a similar extent, in both the hESC-Pg and the EV groups. These functional benefits are likely not due to reduced fibrosis. For EV-treated animals, it is possible that increased vascular density plays a role in functional recovery; however, because hESC-Pg-treated animals had the same capillary density as alpha-MEM control animals, it is unlikely that increased vascular density is a predominant mechanism in the significant cardiac functional improvement observed in cell-treated and EV-treated animals. Rather, gene profiling studies suggest a direct treatment effect on cardiomyocyte biology. These studies demonstrated that compared with control and sham-operated hearts, both hESC-Pg and EV treatments were associated with the upregulation of 927 genes, which, following clustering into functionally relevant pathways, were found to be involved in key processes, such as DNA repair, cell survival, cell cycle progression, and cardiomyocyte contractility. Although our proof-of-concept study was

not designed to further decipher the relative contribution of each of these pathways to the overall outcome, it is plausible to speculate that they may have acted synergistically to improve cardiac function. The molecular links between our progenitor cells and EV and these upregulated genes were not specifically identified either, but there is some evidence that the biologic cargo of EV could be an important linker.^{26,33–35} The idea that cell grafts could be replaced by the sole administration of their secreted EV is of great medical interest, as a cell-free alternative may be safer, with less risk of tumor formation or adverse immunologic reactions. Furthermore, EV-based therapies may be more reproducible, scalable, and controllable than cell therapies, facilitating their translation to the clinic.

Limitations

This study has the following limitations. First, as shown by the analysis of the NanoSight data, the content of the injected EV was heterogeneous with regard to particle size. Additional studies are warranted to assess whether purification of a sub-fraction (exosomes or MP) could yield better functional outcomes. Second, to increase EV release from the cells, the hESC-Pg were stressed by culture under sub-optimal conditions (i.e., on a vitronectin substrate) for 48 hours. An additional advantage of avoiding culture on feeder cells is that the use of such cells would have led to fibroblast-derived EV in the conditioned media, introducing a bias in the interpretation of outcomes. Another potential source of contaminating vesicles could have been from the media itself (e.g., from fetal bovine serum). Such was not the case with our filtered alpha-MEM + B27 medium, which, as discussed earlier, was found to contain only a minimal amount of contaminating particles. One could argue that these culture conditions could have altered the functional competence of the cells, biasing the results in favor of the EV group. However, there is no indication of bias because the functional efficacy of these vitronectin-cultured hESC-Pg (series 2) was similar to the functional efficacy of their freshly sorted counterparts (series 1). This similarity in outcomes might be due to the fact that following their intramyocardial transfer, stem cells incur, *in vivo*, a multiplicity of stresses (because of injection-related damage, hypoxia, inflammation, eventually rejection), which ultimately makes them comparable to their *in vitro* stressed counterparts. The common denominator between these 2 settings (i.e., *in vitro* and *in vivo* stress) could be the release of EV by apoptotic cells. This possibility is indirectly supported by the observation that the injection of cell culture supernatants derived from irradiated apoptotic peripheral blood mononuclear cells mitigates myocardial remodeling in small and large animal models of MI.³⁶

Third, despite the random allocation of mice, baseline functional values were not strictly comparable between hESC-Pg-treated and EV-treated groups. We tried to address this issue by focusing on the comparison of intragroup changes over time. Furthermore, when we

concentrated on a sub-group of hearts with strictly matched baseline functional left ventricular ESV, the same pattern of changes was observed after 6 weeks (i.e., a functional equivalence between hESC-Pg-treated and EV-treated groups and the superiority of both of them over controls). Fourth, although EV were injected immediately after their preparation (fresh), *in vitro* characterization was performed on frozen aliquots. Although freezing vesicles can lead to fusion of smaller particles or fission of larger particles, these events are thought to have been uncommon in our study because qNano analysis revealed a low number of non-spherical particles. Furthermore, NanoSight-based and qNano-based assessments demonstrated similar size distributions despite the fact that the qNano analysis occurred after an additional freeze-thaw cycle.

Finally, our finding that the cardiac function of control groups improved over the study period, albeit less than treatment groups, may indicate an innate potential for compensation or possibly recovery in these chronic heart failure animal models, although the literature suggests that the spontaneous regenerative capacity of the mouse heart is lost after 7 days of age.³⁷ However, this regenerative capacity may be reactivated in hESC-Pg-treated and EV-treated animals. Genetic fate-mapping studies using the MerCreMer-Zeg transgenic mouse model raise the possibility that the pathways involved in reparative processes could be reactivated by cell-released factors.²⁴ The use of this model to determine the origin of new (if any) cardiomyocytes (i.e., maturation of stem and/or progenitor cells or new division of adult cardiomyocytes) is the next step in our studies to address this mechanistic issue and potentially reconcile the improvement of function yielded by hESC-Pg-treated and EV-treated hearts with the lack of sustained donor cell engraftment.

Conclusions

The present results suggest that the cardioprotective effects of hESC-Pg could be recapitulated by the EV that they secrete. Although these data need to be validated by additional studies in small and large animal models, they provide potentially attractive therapeutic perspectives in that the sole administration of cell-derived EV could streamline the translational processes by overcoming several of the manufacturing, regulatory, and cost issues associated with stem cell transplantation. One could potentially grow cells in automated bioreactors and collect and purify their EV, which would be the only biologics administered to the patient. This cell-based but cell-free approach might be the next step of cardiac cell therapy.

Disclosure statement

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

This work was supported by public funds from INSERM, University Paris Descartes, and the LabEx REVIVE and by charity funds from the Fondation de France (FDF/2014 00047970), the

LeDucq Foundation (SHAPEHEART network), and the Association Française contre les Myopathies (ANR-12-RPIB-0015).

The authors thank the Plateforme Génomique of the Institut Cochin (INSERM U1016-CNRS UMR8104-Université Paris Descartes, Paris, France) for performing all the microarray experiments and Ghislaine Frébourg and the Electron Microscopy Facility (FR 3631-CNRS-UPMC) for assisting with cryoelectron microscopy.

Supplementary material

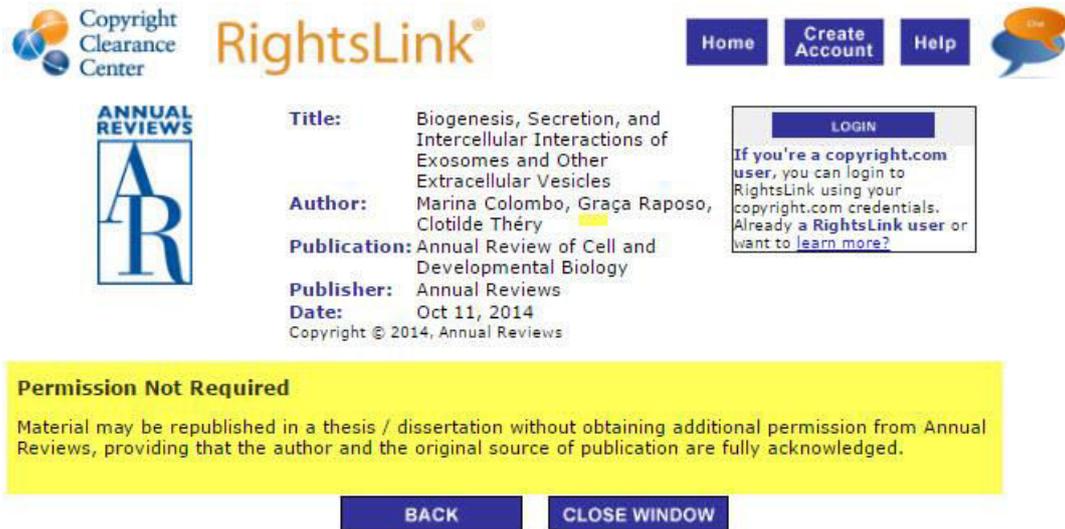
Supplementary materials associated with this article can be found in the online version at www.jhltonline.org.

References

1. World Health Organization. WHO Cardiovascular diseases (CVDs). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Accessed June 16, 2015.
2. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res* 2013;113:810-34.
3. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008;103:1204-19.
4. Timmers L, Lim SK, Hofer IE, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2011;6:206-14.
5. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010;4:214-23.
6. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic Cph Den* 2011;12:1659-68.
7. Hazan-Halevy I, Rosenblum D, Weinstein S, Bairey O, Raanani P, Peer D. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett* 2015;364:59-69.
8. Soares AR, Martins-Marques T, Ribeiro-Rodrigues T, et al. Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Sci Rep* 2015;5:13243.
9. De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol* 2015;6:203.
10. Yin M, Loyer X, Boulanger CM. Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 2015; 763(Pt A):90-103.
11. Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, Fergusson D, Tay J, Allan DS. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev* 2015; 11:150-60.
12. Ibrahim AG-E, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep* 2014; 2:606-19.
13. Blin G, Nury D, Stefanovic S, et al. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest* 2010;120:1125-39.
14. Menasché P, Vanneaux V, Fabreguettes J-R, et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J* 2015;36:743-50.
15. Bellamy V, Vanneaux V, Bel A, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* 2015;34:1198-207.
16. Menasché P, Vanneaux V, Hagège A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015;36:2011-7.

17. Chen D, Liu S, Ma H, et al. Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. *Cancer Cell Int* 2015;15:42.
18. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, et al. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:2206-13.
19. Grange C, Tapparo M, Bruno S, et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med* 2014;33:1055-63.
20. Toeg HD, Tiwari-Pandey R, Seymour R, et al. Injectable small intestine submucosal extracellular matrix in an acute myocardial infarction model. *Ann Thorac Surg* 2013;96:1686-94: discussion 1694.
21. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinforma Oxf Engl* 2003;19:185-93.
22. Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:34.
23. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2009; 119:2808-17.
24. Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007;13:970-4.
25. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013;12:689-98.
26. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekula M, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived microvesicles transmit RNAs and proteins to recipient mature heart cells modulating cell fate and behavior. *Stem Cells* 2015;33:2748-61.
27. Oskouei BN, Lamirault G, Joseph C, et al. Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:116-24.
28. Li T-S, Cheng K, Malliaras K, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:942-53.
29. Zheng S-X, Weng Y-L, Zhou C-Q, et al. Comparison of cardiac stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on the cardiac electrophysiology in rats with myocardial infarction. *Stem Cell Rev* 2013;9:339-49.
30. Citro L, Naidu S, Hassan F, et al. Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PloS One* 2014;9: e116281.
31. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006;20:1487-95.
32. Alonso-Betanzos A, Bolón-Canedo V, Heyndrickx GR, Kerkhof PL. Exploring guidelines for classification of major heart failure subtypes by using machine learning. *Clin Med Insights Cardiol* 2015;9(Suppl 1): 57-71.
33. Seeger FH, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNAs in stem cell function and regenerative therapy of the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1739-46.
34. Ibrahim AG-E, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep* 2014; 2:606-19.
35. Gangoda L, Boukouris S, Liem M, Kalra H, Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics* 2015;15:260-71.
36. Lichtenauer M, Mildner M, Hoetzenecker K, et al. Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study. *Basic Res Cardiol* 2011;106:1283-97.
37. Haubner BJ, Adamowicz-Brice M, Khadayate S, et al. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction. *Aging* 2012;4:966-77.

Annexe 3 :



The screenshot displays the Copyright Clearance Center RightsLink interface. At the top left is the Copyright Clearance Center logo. The main header features the 'RightsLink' logo and navigation buttons for 'Home', 'Create Account', and 'Help'. On the right, there is a 'Chat' icon. The central content area shows a document record with the following details:

- Title:** Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles
- Author:** Marina Colombo, Graça Raposo, Clotilde Théry
- Publication:** Annual Review of Cell and Developmental Biology
- Publisher:** Annual Reviews
- Date:** Oct 11, 2014

Below the record, a yellow box contains the text: "Permission Not Required. Material may be republished in a thesis / dissertation without obtaining additional permission from Annual Reviews, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged." To the right of the record, there is a 'LOGIN' button and a text box that reads: "If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to learn more?" At the bottom of the yellow box are two buttons: 'BACK' and 'CLOSE WINDOW'.

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème majeur de santé publique. La pénurie des greffons cardiaques et la résistance de nombreux patients aux traitements conventionnels ont poussé les chercheurs à développer de nouvelles thérapies dont la thérapie cellulaire. Bien que l'idée initiale de la thérapie cellulaire ait été de repeupler la partie nécrosée du cœur par l'administration de cellules viables et fonctionnelles, leur disparition rapide alors que les bénéfices perdurent dans le temps a conduit à l'hypothèse que les cellules agiraient via un mécanisme paracrine. Les vésicules extracellulaires (VE), incluant les exosomes et les microparticules, seraient principalement impliquées dans ce processus. Elles agiraient ainsi comme de véritables navettes transportant des biomolécules actives permettant d'activer des voies de réparation endogènes dans le tissu traité. Ce projet de thèse a pu mettre en évidence :

1. La non-infériorité des VE issues de progéniteurs cardiovasculaires (Pg) dérivés de cellules souches embryonnaires humaines par rapport à leurs cellules d'origine dans un modèle murin d'IC chronique (ICC). Ces VE activeraient des voies de signalisation endogènes impliquées dans la stimulation de la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la réparation de l'ADN et la diminution de la fibrose. Leur contenu moléculaire spécifique, et notamment les microARN, pourrait être impliqué dans ces phénomènes.
2. L'importance du choix du type cellulaire dans la production de VE efficaces sur le plan thérapeutique puisque ni les VE dérivées de cardiomyocytes matures ni celles de cellules souches mésenchymateuses n'ont eu d'effets bénéfiques sur la fonction cardiaque de souris en ICC.
3. L'implication des VE dans l'effet paracrine des cellules, confirmée par l'amélioration de la fonction cardiaque chez des souris présentant une ICC traitées avec des VE issues de Pg dérivés d'iPS. Des tests fonctionnels *in vitro* ont montré que les VE auraient un rôle pro-angiogénique, pro-prolifératif et amélioreraient la survie des cellules.

Une thérapie a-cellulaire aurait une réelle pertinence clinique en réglant une partie des problèmes techniques, immunologiques et sécuritaires associés aux greffes de cellules. Si cette hypothèse est confirmée, il pourrait en résulter une simplification des problèmes réglementaires, une diminution des coûts de production et de ce fait une plus grande diffusion clinique de la méthode.

Mots clés : Vésicules extracellulaires, Thérapie cellulaire, Insuffisance cardiaque, Progéniteurs cardiovasculaires, microARN.

Abstract

Heart failure (HF) is a major public health concern. The lack of donor hearts and the resistance of numerous patients to conventional treatments has led scientists to develop new therapies such as cell therapy. The initial goal of cell therapy was to repopulate the infarcted heart by directly injecting viable and functional cells. However, the rapid disappearance of the transplanted cells contrasts with their long term, ongoing functional benefits, suggesting that cells may act through a paracrine mechanism. Extracellular vesicles (EV), including exosomes and microparticles, may be key to this process, acting as shuttles to transport bioactive macromolecules that stimulate endogenous repair pathways in the host tissue. This PhD project demonstrates:

1. The non-inferiority of EV secreted by cardiovascular progenitors (Pg) derived from human embryonic stem cells as compared to their parent cells in a mouse model of chronic HF (CHF). These EV could act by the activation of endogenous signaling pathways implicated in cell proliferation, survival, DNA repair and decreased fibrosis. Their specific content, such as miRNA, could be involved in these benefits.
2. The importance of the cell type in the production of therapeutically effective EV, since EV derived from mature cardiomyocytes and mesenchymal stem cells did not improve cardiac function in mice with CHF.
3. The importance of EV in paracrine effects of cells, confirmed by the improvement of cardiac function in mice with CHF treated with EV secreted by Pg derived from iPS cells. *In vitro* data shows that EV might have pro-angiogenic, pro-proliferative and pro-survival effects.

An acellular therapy should be clinically relevant by reducing technical, immunological and safety problems associated with cell transplantation. If this hypothesis is confirmed, regulatory concerns would be simplified and production costs reduced, facilitating large-scale production.

Keywords: Extracellular vesicles, Cell therapy, Heart failure, Cardiovascular progenitors, microRNA