



HAL
open science

Élaboration de différents biomatériaux dans une perspective thérapeutique de l'insuffisance cardiaque

Solène Boitard

► **To cite this version:**

Solène Boitard. Élaboration de différents biomatériaux dans une perspective thérapeutique de l'insuffisance cardiaque. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066762 . tel-03509779

HAL Id: tel-03509779

<https://theses.hal.science/tel-03509779>

Submitted on 4 Jan 2022

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 PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

(Ecole doctorale ED394)

Présentée par

Mlle Solène E. BOITARD

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Élaboration de différents biomatériaux
dans une perspective thérapeutique
de l'insuffisance cardiaque**

Soutenue le 22 septembre 2016, devant un jury composé de :

Dr. Thibaud CORADIN	Président du Jury
Dr. Catherine LEVISAGE	Rapporteur
Pr. Stéphane BLOT	Rapporteur
Pr. Philippe MENASCHE	Examineur
Dr. Laurent MULLER	Examineur
Dr. Jane-Lise SAMUEL	Examineur
Pr. Onnik AGBULUT	Directeur de thèse



“Savoir s’étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte.” Louis Pasteur

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail : le président du jury : Dr. Thibaud Coradin spécialiste de la chimie des biomatériaux ; mes rapporteurs : Dr. Catherine LeVisage pour son expertise dans le domaine des biomatériaux pour la régénération tissulaire, Pr. Stéphane Blot pour ses travaux sur la thérapie cellulaire chez le chien atteint de dystrophie musculaire de Duchenne ; mes examinateurs : Dr. Laurent Muller spécialiste de l'angiogénèse, Dr. Jane-Lise Samuel pour ses connaissances dans les maladies cardiovasculaires, et Pr. Philippe Menasché, chirurgien cardiothoracique et expert en thérapie cellulaire cardiaque clinique.

Je tiens à remercier la région Ile de France - DIM Biothérapies ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement de ma thèse et du projet « Patch Cardiaque ».

Ce travail de thèse est avant tout le fruit d'une belle rencontre humaine et n'aurait jamais vu le jour sans mon directeur de thèse : Pr. Onnik Agbulut. Quand je suis arrivée la première fois dans l'équipe, j'étais très loin d'imaginer tout ce que ce stage allait m'apporter. Onnik a tout de suite accepté de me donner ma chance et je ne le remercierai jamais assez. Une place de professeur, un déménagement à l'UPMC, de nombreux gâteaux, beaucoup de débrouille et de rigolade, et la constitution d'une nouvelle équipe ont fait de ses 6 années de collaboration une véritable aventure de vie. Je tiens à le remercier pour son écoute, son soutien, sa joie de vivre et son enseignement.

Un grand merci à toute l'équipe du Pr. Onnik Agbulut : Solenne (alias Solène 2), Camille, Alexandre, Angélique, Barbara, Takouhie, Marième, et notamment Pierre pour son aide précieuse, sa patience, son écoute, son soutien et ses conseils tout au long de ces 6 années.

Je remercie tous les membres du laboratoire « Adaptation Biologique et Vieillesse » notamment Pr. Bertrand Friguet pour son accueil au sein de l'UPMC, plus particulièrement toute l'équipe du Dr. Zhenlin Li et Mathias Mericskay pour leur collaboration scientifique notamment Ara, Denise, Cynthia et Robin, mon fidèle allié au bloc. Remerciement spécial à Aurore pour m'avoir fait confiance concernant la santé de Marcelle.

J'ai également une pensée pour ceux de mon ancienne équipe de Paris Diderot, qui ont été présents pendant mes trois premières années de stage et qui sont encore aujourd'hui toujours présents pour me conseiller. Je tiens à remercier plus particulièrement mes acolytes et amies Nathalie et Alice qui ont toujours été présentes pour moi et avec qui j'ai partagé tant de bons moments.

Je tiens à remercier toute l'équipe du Pr. Menasché qui m'a accueillie si souvent dans le laboratoire et dans le bloc de microchirurgie et qui m'ont fait me sentir « comme

chez moi ». Un grand merci à Valérie Bellamy, Nisa, Anaïs, Nermine, Jeanne, Adrien, Julie, Chantal et Laetitia. Un grand merci également aux anciens doctorants de l'équipe : Damelys, Yohan, et Hadhami qui m'ont formée tout au long de mon master.

Je remercie chaleureusement l'équipe du Dr. Yong Chen et notamment Dr. Maria Kitsara qui ont collaboré avec nous pour l'obtention des biomatériaux. Un grand merci à Maria pour notre escapade à Gif-sur-Yvette et à Bin pour son enthousiasme.

Je remercie également nos nombreux collaborateurs avec qui j'ai pris plaisir à travailler et qui n'ont pas manqué de délivrer de précieux conseils : l'équipe du Pr. Arnaud Ferry dont Pauline, l'équipe du Dr. Jean-Thomas Vilquin dont Cyril et Jessie, le Dr. Christophe Hourdé et le Dr. Philippe Noirez.

Je souhaite également remercier l'équipe du Dr. Jérôme Larghero et Valérie Vanneaux pour leur expertise dans le domaine des cellules souches ainsi que l'entreprise Biom'up qui nous a fourni le collagène clinique.

Un grand merci à l'équipe du Dr. Laurent David à Lyon pour leur travail sur les patches de chitosan ainsi que l'équipe du Dr. Guy Schlatter à Strasbourg dont Corine pour leur travail sur le collagène électrospinné.

Je remercie également l'équipe du Pr. Fernando Lima dont Cécile, ainsi que le Pr. Christophe Magnan à l'Université Paris Diderot, avec qui j'ai collaboré sporadiquement.

Je souhaiterais remercier également mes enseignants Orléannais qui m'ont donné envie de faire de la recherche : Dr. Stéphane Mortaud et Dr. Olivier Richard.

Que serait la science sans nos fidèles compagnons à quatre pattes. Je tiens à remercier du fond du cœur tous les rongeurs qui contribuent chaque jour à faire progresser la science.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier mes proches : mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont donné envie de les rendre fiers, ma sœur, mon beau-frère et mes neveux, mes grands-parents, mes oncles, tantes, cousins et cousines, ma (future) belle-famille et surtout Geneviève pour son aide, mes meilleurs amis Arthur et Apolline, ainsi que tous mes amis qui m'ont soutenue dès le début. Une pensée spéciale à Cety qui lui aussi, à sa manière, a joué un rôle dans ce travail de thèse.

Le meilleur pour la fin. Je souhaiterais dire un grand merci à mon compagnon Pierre, sans qui rien n'aurait été possible. De tout ceux qui m'ont accompagnée durant toutes ces années, tu es celui qui m'aura le plus poussée, soutenue, conseillée, encouragée et accompagnée. Dans les moments de joies et de doutes, tu étais là et tu as toujours cru en moi. Cette réussite est aussi la tienne. Merci d'être entré dans ma vie.

A mon grand-père Jacques,

Remerciements	3
Abréviations	9
Préambule.....	11
Présentation générale de la thèse.....	12
Préambule : Les différents niveaux d'étude du cœur	12
1. Au niveau de l'organe cardiaque.....	12
2. Au niveau du tissu cardiaque.....	14
3. Au niveau du cardiomyocyte contractile	17
Introduction générale	20
Partie 1 : Insuffisance cardiaque	21
1. Description et origines de l'insuffisance cardiaque	21
2. La cardiomyopathie dilatée.....	23
3. L'infarctus du myocarde	24
4. Adaptation cardiaque et remodelage.....	24
5. Régénération cardiaque	27
6. Traitements de l'insuffisance cardiaque.....	28
Partie 2 : Thérapie cellulaire cardiaque	31
1. Principe de la thérapie cellulaire	31
2. Les sources de cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque	31
3. Choisir les cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque	34
4. Cellules dérivées des cellules souches pluripotentes : avantages et inconvénients	35
5. Stratégies d'apport des cellules au myocarde	38
6. Les limites de la thérapie cellulaire	39
Partie 3 : Biomatériaux pour la greffe épigardique	41
1. Caractéristiques des biomatériaux pour la thérapie cellulaire cardiaque	41
2. Sources des biomatériaux.....	41
3. Structure et formulation des biomatériaux pour la thérapie cellulaire cardiaque.....	43
4. Interactions hôte-biomatériaux.....	45
Partie 4 : Projet et objectifs de ma thèse	49
Bibliographie de l'introduction	50
Chapitre 1 : Evaluation de l'implantation de feuilles de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux et myoblastes associées aux progéniteurs cardiaques murins dans un modèle animal de cardiomyopathie dilatée	57
Introduction et présentation du projet	58

1. Intérêt des feuilles de cellules	58
2. Les progéniteurs cardiovasculaires dérivés des cellules souches embryonnaires	59
3. Présentation des projets	59
Matériel et méthode.....	61
1. Obtention des feuilles de cellules	61
2. Planification des expérimentations et constitution des groupes	63
3. Coloration X-Gal.....	63
4. Analyses immunohistochimiques	64
5. Expression génique	64
Résultats	65
1. Etude des feuilles de cellules mésenchymateuses issu du tissu adipeux (ADSC)	65
2. Etude des feuilles de myoblastes associées aux progéniteurs cardiaques de souris	68
Conclusion	71
Discussion et perspectives.....	72
Bibliographie du chapitre 1	74
Chapitre 2 : Développement d'une matrice en nanofibres de collagène supportant des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines pour le traitement des cardiomyopathies dilatées	77
Introduction et présentation du projet	78
1. Le collagène	79
2. Les biomatériaux et la technique d'électrospinning :	82
3. Les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes humaines	83
4. Le projet CardiacPatch	85
Méthodologie détaillée	87
1. Obtention des patches en nanofibres de collagène	87
2. Culture cellulaire.....	93
3. Animaux	96
Résultats	106
1. Caractéristiques physiques des matrices de collagène	106
2. Biocompatibilité des matrices de collagène	110
3. Association des matrices de collagène avec les hiPS-CM	122
4. Etude de la fonction cardiaque après greffe des matrices CA 10%+ hiPS-CM	125
5. Analyses histologiques des matrices CA 10%+ hiPS-CM après la greffe	127
6. Recherche des cellules humaines greffées.....	127

7. Etude de l'angiogenèse et de l'expression de SRF	128
8. Adhésion des matrices de collagène avec le myocarde et remodelage matricielle.....	130
9. Amélioration de la rétention des cellules sur les patches	134
10. Amélioration des matrices par alignement des nanofibres	136
11. Association des matrices de collagène avec un support micropatterné	138
Conclusion	141
Discussion et perspectives.....	144
Bibliographie du Chapitre 2	149
Chapitre 3 : Etude biologique d'un hydrogel naturel de chitosane acellulaire pour la revascularisation de la zone infarctée pour les cardiopathies ischémiques .	153
Introduction et présentation du projet	154
1. Le chitosane	154
2. Thérapie cellulaire cardiaque et chitosane.....	155
3. Présentation du projet.....	155
Matériel et méthode.....	157
1. Préparation des hydrogels physiques de chitosane.....	157
2. Evaluation physico-chimique du chitosane	157
3. Obtention du modèle ischémique et implantation des hydrogels de chitosane	158
4. Histologie et immunomarquage	160
5. Observation par IRM des cœurs infarctés après greffe des patches de chitosane	161
Résultats	162
1. Caractérisation physico-chimique des hydrogels de chitosane.....	162
2. Evaluation biologique des hydrogels de chitosane	165
Conclusion	170
Discussion et Perspectives	171
Bibliographie du chapitre 3.....	173
Conclusion, Discussion et Perspectives Générales de la thèse	175
Conclusion générale.....	176
Discussion et perspectives générales.....	178
1. Choix du modèle	178
2. Paramètres affectants la survie des cellules	179
3. Exosomes	181
Bibliographie.....	183

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADSC : cellule souche dérivé du tissu adipeux
ANF : facteur natriurétique atrial
ARN : acide ribonucléique
BSA : sérum albumine bovine
BMP : protéine morphogénique osseuse
BNP : peptide natriurétique du cerveau
CA : acide citrique
CD : cluster de différenciation
CMD : cardiomyopathie dilatée
CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DC : dichroïsme circulaire
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique
ESC : cellule souche embryonnaire
FE : fraction d'éjection
FGF : facteur de croissance des fibroblastes
FITC : Fluorescéine isothiocyanate
FR : fraction de raccourcissement
GFP : protéine fluorescente verte
GMEM : milieu essentiel minimum de Glasgow
HE : hématoxyline - éosine
HIF : facteur induit par l'hypoxie
HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
IDM : infarctus du myocarde
iPSC : cellule souche pluripotente induite
IRM : imagerie par résonance magnétique
MEC : matrice extracellulaire
MHC : chaîne lourde de la myosine
MMP : métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
NP40 : nonidet (ou nonyl phénoxyéthoxyéthanol)P40
NUBP : protéine de liaison aux nucléotides

OCT : facteur de transcription de liaison aux octamers
PBS : tampon phosphate salin
PCL : poly-caprolactone
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PDMS : polydiméthylsiloxane
PLA : acide poly-lactique
PEG : poly-éthylène-glycol
PU : polyuréthane
TIMP : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
RCM : cardiomyocytes de rat
RGB : rouge - vert - bleu
ROCK : protéine kinase associée à rho
RPMI : milieu du Roswell Park Memorial Institute
RS : rouge sirius
SRF : facteur de réponse au
SRP : particule de reconnaissance du signal
SSEA : antigène de l'état spécifique embryonnaire
VEGF : facteur de croissance des cellules vasculaires
VG/VD : ventricule gauche/ventricule droit
VTD : volume télédiastolique
VTS : volume télésystolique
SDF : facteur dérivé des cellules stromales
SCF : facteur des cellules souches
SHP : sodium hypophosphite
SEM : erreur standard à la moyenne
IGF : facteur de croissance ressemblant à l'insuline
HGF : facteur de croissance humain
ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

Préambule

Présentation générale de la thèse

Au sein de ce travail doctoral, l'effet thérapeutique de différents biomatériaux a été analysé dans un contexte d'insuffisance cardiaque. Ce manuscrit est donc organisé en fonction de la nature des projets dans lesquels je me suis impliqué. Je détaillerai succinctement, dans ce préambule, la physiologie cardiaque puisque l'altération de la fonction cardiaque et son rétablissement sont au cœur de ces projets de recherche. En introduction générale, je m'attarderai sur les enjeux actuels du domaine de la thérapie cellulaire cardiaque et les développements récents des biomatériaux utilisés dans ce domaine. Puis, ce manuscrit de thèse est découpé en trois parties distinctes. Elles correspondent aux trois stratégies que nous avons explorées pour améliorer les résultats de la greffe épicaudique de cellules dans le cadre de la thérapie cellulaire cardiaque. Chaque partie sera ainsi abordée par une petite introduction suivie de la description des méthodes utilisées et des résultats obtenus. Pour finir, dans une toute dernière partie, je discuterai et conclurai sur l'ensemble des résultats obtenus.

Les différents niveaux d'étude du cœur

1. Au niveau de l'organe cardiaque

a) Anatomie cardiaque

Le muscle cardiaque possède une structure tridimensionnelle de forme ellipsoïde et est situé dans la cavité thoracique entre les deux lobes pulmonaires. De par sa nature, le cœur est capable de se contracter de manière régulière et autonome. Il a ainsi comme principale fonction de véhiculer le sang, dans un premier temps vers les poumons pour l'oxygéner puis, dans un second temps, vers l'ensemble de l'organisme pour apporter nutriments et oxygène aux différents organes. C'est en cela qu'il peut être assimilé à un organe-pompe. Un cœur humain pèse en moyenne 300 grammes et se contracte périodiquement avec une fréquence moyenne au repos de 70 battements par minute, éjectant à chaque battement cardiaque pas moins de 80 mL de sang. Chez un individu sain, le débit cardiaque est en moyenne de 5,6 litres par minute. Le cœur est composé de quatre chambres (*Figure 1*) : l'oreillette droite (OD), l'oreillette gauche (OG), le ventricule droit (VD) et le ventricule gauche (VG). Le sang dépourvu d'oxygène arrive dans l'oreillette droite par la veine cave supérieure et inférieure. L'oreillette droite se contracte pour faire passer le sang dans le ventricule droit au travers de la valve tricuspide. Une fois dans le ventricule droit, il est envoyé dans l'artère pulmonaire au travers de la valve pulmonaire pour irriguer les poumons et se charger en oxygène. Le sang oxygéné sort des poumons par les veines pulmonaires droites et gauches et retourne au cœur par l'oreillette gauche. La contraction de l'oreillette gauche fait transiter le sang à travers la valve mitrale dans le ventricule gauche qui est ensuite propulsé dans l'aorte pour irriguer tous les organes du corps. La partie droite du cœur correspond donc à la circulation pulmonaire tandis

que celle de gauche correspond à la circulation systémique. La fonction cardiaque est souvent résumée à l'activité du ventricule gauche.

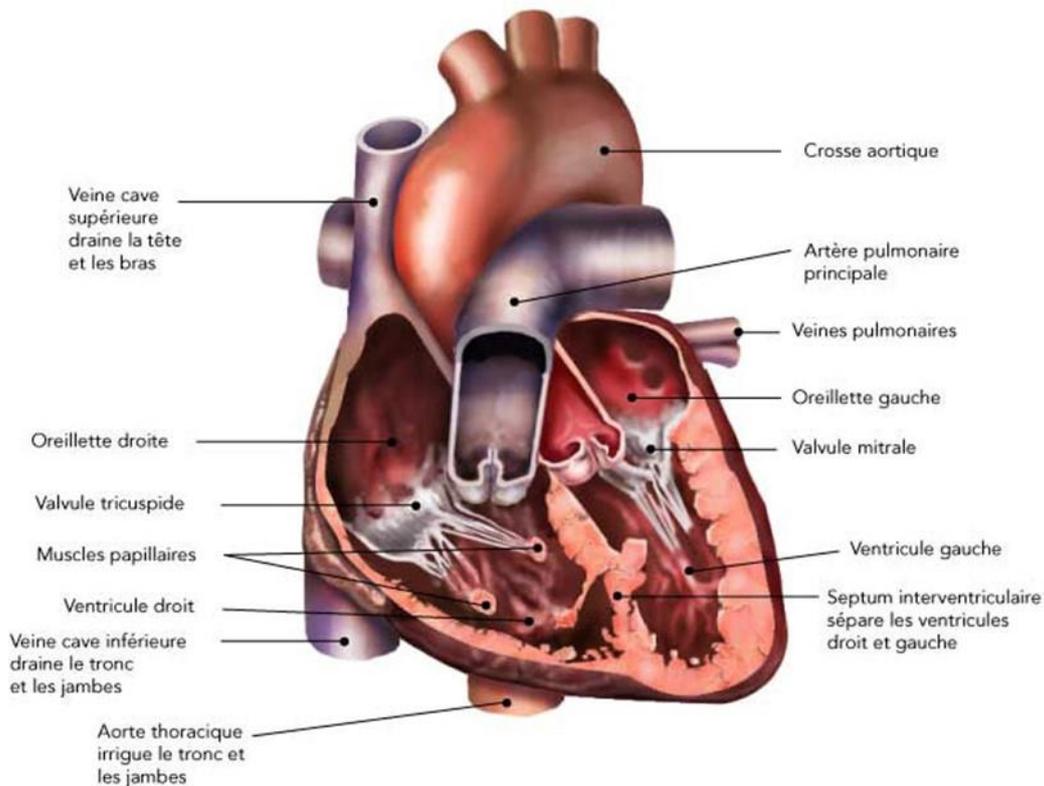


Figure 1 : Schématisation du cœur.

b) Le cycle cardiaque et les différents paramètres de contractilité

Le cycle cardiaque est composé d'une période de contraction complète du cœur : la systole, suivi d'une période de relâchement complet : la diastole. Il y a un synchronisme entre l'activité du cœur droit (OD et VD) et celle du cœur gauche (OG et VG). Pour rentrer dans les détails, le cycle cardiaque est composé de trois étapes successives (exemple du ventricule gauche : *Figure 2*).

(1) La valve aortique est fermée et le sang des veines pulmonaires s'écoule dans l'oreillette gauche. Le ventricule est en cours de relaxation. La contraction auriculaire fait passer le sang à travers la valve mitrale dans le ventricule gauche : c'est la phase de remplissage ventriculaire.

(2) Une fois que le sang est dans le VG, la pression augmente car le ventricule commence à se contracter tout en maintenant fermée la valve aortique. Le volume du cœur ne varie pas (c'est une phase isovolumique). Lorsque cette pression dépasse celle de la pression de l'aorte, la valve aortique s'ouvre, le sang est propulsé dans la circulation systémique. Le volume ventriculaire diminue. C'est une phase de systole ventriculaire qui permet d'éjecter hors du cœur un volume de sang correspondant à 70-80 mL. Pendant ce temps, les oreillettes se relâchent (diastole) et le sang s'écoule à l'intérieur.

(3) Le ventricule se relâche complètement (diastole) et la pression étant devenue plus faible que dans l'aorte induit la fermeture de la valve aortique et le début d'un nouveau cycle cardiaque.

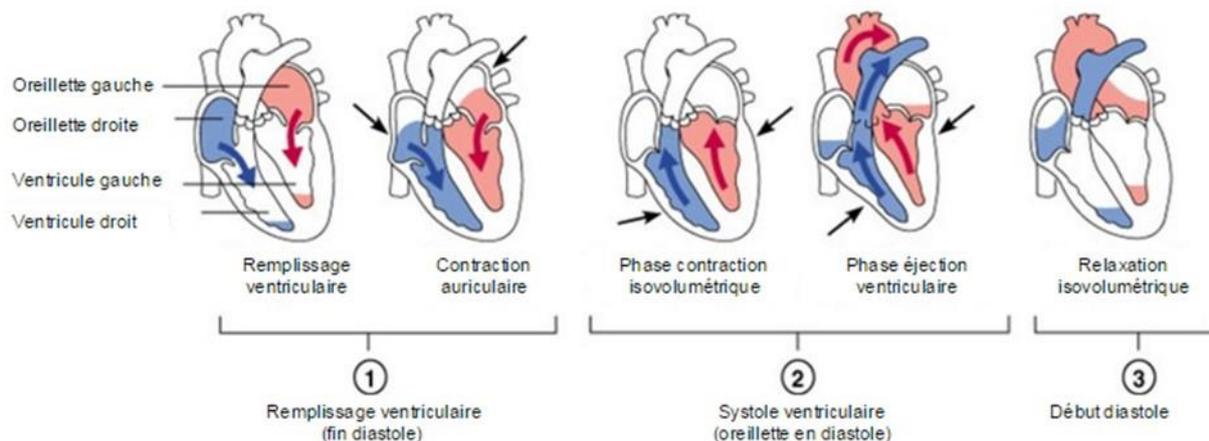


Figure 2 : Schématisation des principales étapes du cycle cardiaque.

A partir du cycle cardiaque, il est possible de définir plusieurs paramètres permettant d'évaluer la bonne contractilité du cœur :

- Fréquence cardiaque (ou FC) : le nombre de battements (ou pulsations) par unité de temps (en battements par minute)
- Volume télédiastolique (ou VTD) : volume maximal atteint quand le cœur est le plus relâché
- Volume télésystolique (ou VTS) : volume minimal atteint quand le cœur est le plus contracté
- Diamètre télédiastolique (ou DTD) : diamètre maximal atteint quand le cœur est le plus relâché
- Diamètre télésystolique (ou DTS) : diamètre minimal atteint quand le cœur est le plus contracté
- Volume d'éjection systolique (ou VES) : le volume de sang qui est éjecté hors du cœur au moment de la systole (en mL). Il correspond à la différence entre VTD et VTS.
- Le débit cardiaque (Qc) : FC x VES (en litre par minute)
- Fraction d'éjection (ou FE) : pourcentage de sang éjecté à chaque battement cardiaque (en %) qui se calcule de la manière suivante :

$$FE = [(VTD - VTS) / VTD] \times 100$$
- FEVG : fraction d'éjection du Ventricule Gauche
- Fraction de raccourcissement (ou FR) : pourcentage de diminution du diamètre cardiaque qui se calcule ainsi : $FR = [(DTD - DTS) / DTD] \times 100$.

2. Au niveau du tissu cardiaque

Le tissu cardiaque est composé de plusieurs feuillets cellulaires (voir *Figure 3*) :

- Le péricarde : couches de tissu conjonctif qui entourent le cœur. Il est composé d'un feuillet viscéral qui enveloppe le cœur (ou épicarde) et qui se prolonge sur l'aorte et l'artère pulmonaire ainsi que sur les veines caves et pulmonaires, et d'un feuillet pariétal qui correspond à la partie externe du péricarde. Le péricarde est un feuillet qui délimite la cavité péricardique et facilite les mouvements cardiaques.
- L'épicarde : feuillet cellulaire externe du cœur qui correspond au péricarde viscéral.
- L'épicarde et le myocarde sont séparés par une couche sous-épicardique qui rassemble le tissu adipeux cardiaque, les nerfs et la vascularisation coronarienne.
- Le myocarde : feuillet cellulaire médian contenant notamment les cellules cardiaques spécialisées : les cardiomyocytes qui permettent la contraction cardiaque.
- Le myocarde est séparé de l'endocarde par une couche sous-endocardique constituée de tissu conjonctif, de cellules qui induisent l'activité électrique du cœur ainsi que d'une importante vascularisation.
- L'endocarde : mince membrane endothéliale interne du cœur constituée d'un endothélium bordant la lumière du cœur et d'une couche conjonctive sous-endothéliale qui sont séparés par des fibres de collagène.

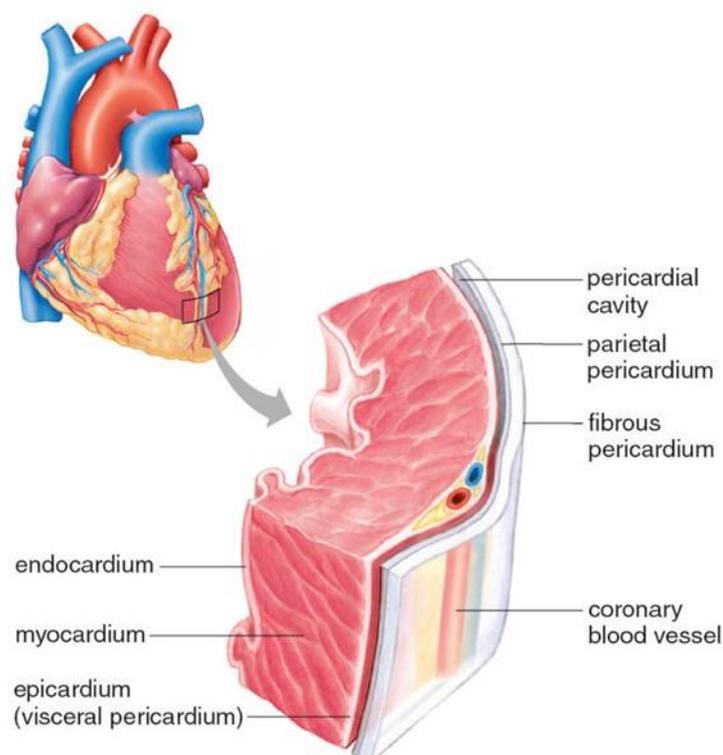


Figure 3 : Représentation schématique des différents feuillets du tissu cardiaque.

a) Le myocarde

Le myocarde est un tissu musculaire strié. Il comporte des fibres en réseau irrégulier de cellules reliées entre elles par des stries scalariformes. C'est le tissu le plus important du cœur.

b) Activité électrique du cœur

Le cœur possède un système de conduction qui lui est propre : le muscle cardiaque est donc capable de se contracter sans stimulation externe (autorythmicité). Au sein du myocarde, sont présentes des cellules spécialisées qui initient la contraction cardiaque en se dépolarisant : c'est le tissu nodal ou nœud. Il existe un nœud sino-atrial (le nœud de Keith et Flack) situé sous la veine cave supérieure dans l'oreillette droite ; et le nœud atrio-ventriculaire (Aschoff-Taware) situé entre la valve tricuspide et le septum. Ces nœuds se prolongent en faisceau de His. L'ensemble formant le réseau de Purkinje. Le nœud sino-atrial possède des cellules dites pacemakers car ce sont elles qui se dépolarisent en premier et induisent le cycle cardiaque par la contraction atriale. Elles ont conservé un phénotype fœtal avec un fonctionnement métabolique basé sur les glucides et non sur les lipides, une structure sarcomérique plus petite qu'un cardiomyocyte ventriculaire et un arsenal protéique différent (les myosines notamment) ainsi que des canaux calciques et potassiques différents qui sont à l'origine de leur potentiel de dépolarisation.

Le signal électrique, ou potentiel d'action, est initié dans les cellules pacemakers atriales et se propage de cardiomyocytes en cardiomyocytes. Les cardiomyocytes ventriculaires vont participer à la contraction cardiaque. Chaque cellule va se dépolariser par une entrée d'ion Sodium Na^+ puis se polariser par une entrée d'ion calcium Ca^{2+} selon le schéma indiqué en *Figure 4*. Le potentiel électrique du myocyte automatique est instable, la cellule est donc capable de se dépolariser spontanément. Les cellules contractiles ont besoin d'un stimulus électrique autrement dit de la transmission d'un potentiel d'action par une cellule voisine.

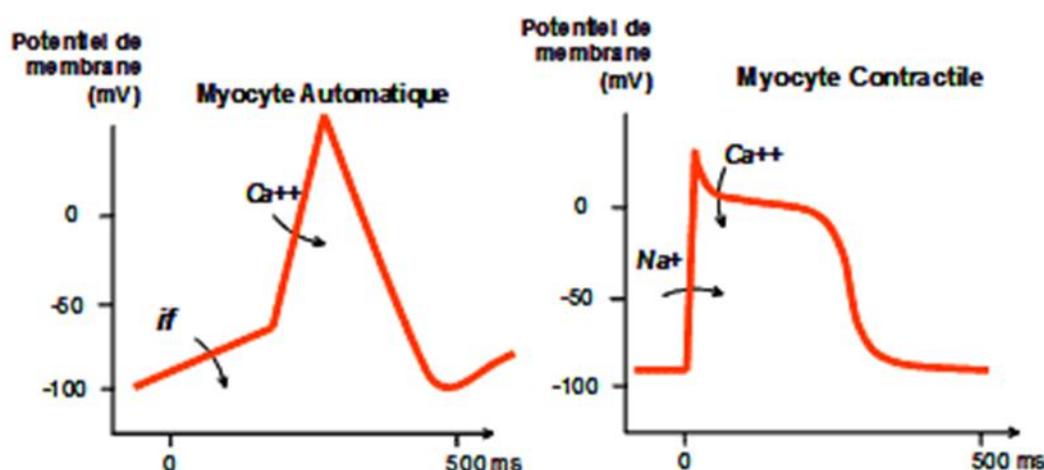


Figure 4 : Représentation graphique du potentiel d'action (ou PA) dans les cellules pacemakers (ou cellules automatiques) et dans les cardiomyocytes non-automatiques (ou cellules contractiles).

Ce signal électrique peut se propager facilement car les myocytes cardiaques communiquent entre eux de manière étroite. Le potentiel d'action se propage dans le cœur à la vitesse de 1 mètre par seconde dans le nœud sino-atrial et 3 à 5 mètres par seconde dans le faisceau de His. Les cellules cardiaques sont des cellules dites striées. A travers les stries scalariformes, il existe un contact étroit entre les extrémités des cellules ce qui permet la diffusion rapide du signal électrique à l'origine de la contraction synchronisée du myocarde. Le tissu myocardique est donc assimilé à un syncytium bien que les cardiomyocytes soient des cellules individuelles (à la différence du muscle squelettique).

On retrouve trois types de jonctions communicantes au sein du myocarde :

- Les desmosomes qui permettent l'adhérence des cardiomyocytes entre eux et évitent que les contractions cardiaques ne séparent les cellules.
- Les zonula adhaerens qui ont un rôle d'ancrage intercellulaire. Ils font la liaison entre les filaments d'actine des sarcomères d'une cellule à l'autre.
- Les jonctions communicantes, ou jonction GAP, qui correspondent aux zones de faibles résistances permettant ainsi la transmission des signaux contractiles entre deux cardiomyocytes.

3. Au niveau du cardiomyocyte contractile

a) Niveau cellulaire

Le cardiomyocyte est une cellule possédant des unités contractiles régulières (le sarcomère) et contenant 1 à 2 noyaux situés à la périphérie de la cellule. La séparation entre deux cardiomyocytes est appelée le disque intercalaire (*Figure 5*).

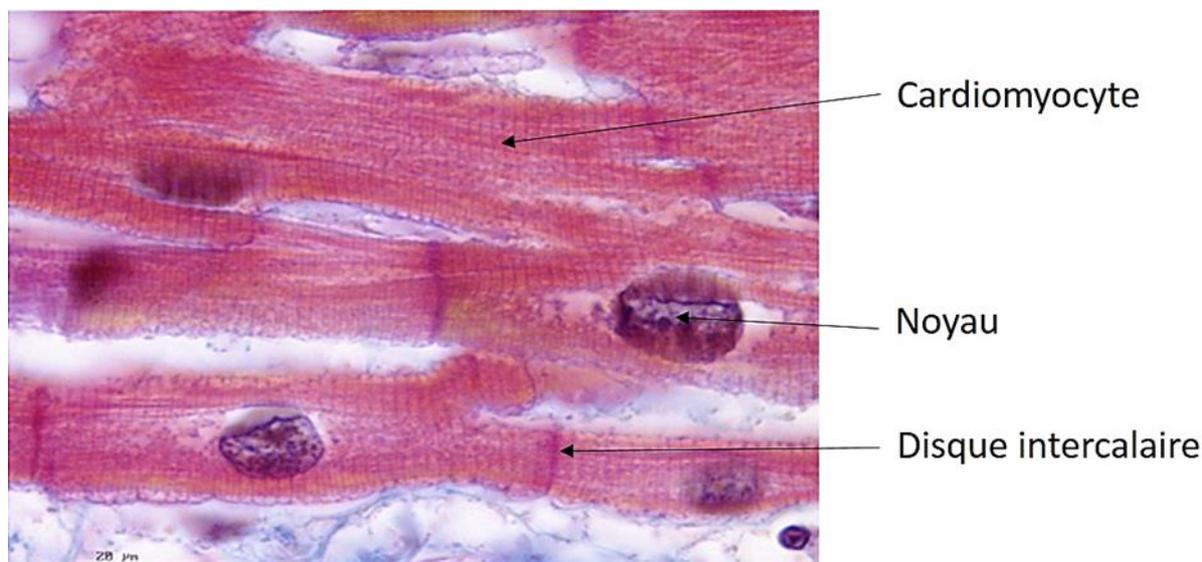


Figure 5 : Coupe longitudinale de cardiomyocytes humains après coloration trichrome de Masson, x1000.

Le sarcomère est un ensemble de filaments d'actine et de myosine qui coulissent les uns entre les autres donnant à la cellule une capacité contractile (*Figure 6*). Au niveau du sarcomère il y a différentes protéines telles que la troponine, la tropomyosine

et la titine qui permettent aux têtes de myosine de glisser sur les filaments d'actine afin d'effectuer la contraction cardiaque.

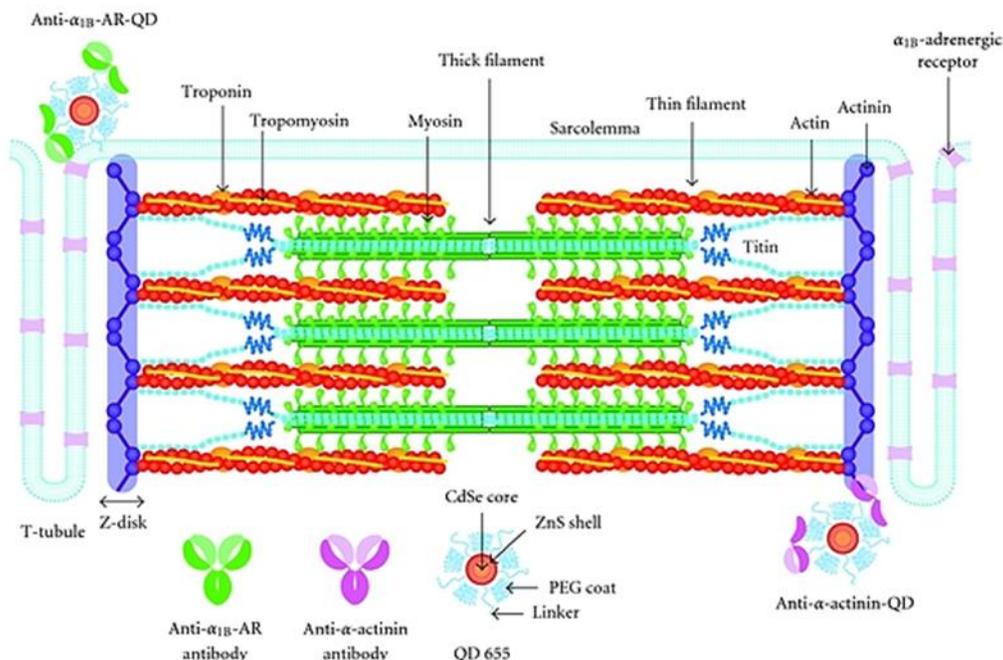


Figure 6 : Description des molécules présentes dans un sarcomère cardiaque (Koburumaki-Shimozawa et al. 2012).

b) Couplage excitation-contraction

Comme décrite précédemment, la contraction du cardiomyocyte contractile est dépendante de l'excitation électrique d'une autre cellule. La contraction cardiaque est ainsi dépendante du flux calcique. Après la dépolarisation de la cellule, le calcium entre dans la cellule au niveau des replis du cardiomyocyte appelés tubules T. Cette entrée de calcium dans la cellule par le canal calcium dépendant de type L. induit la libération massive du calcium intracellulaire qui était amassé dans le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries (phénomène de calcium induit - calcium release). Le calcium va se fixer sur la troponine C au niveau des sarcomères ce qui va entraîner la liaison des filaments d'actine avec les têtes de myosine. Les filaments d'actine vont être parcourus par les myosines réduisant ainsi la taille des sarcomères : c'est la contraction. Une molécule d'ATP est ensuite hydrolysée entraînant la séparation physique des têtes de myosine des filaments d'actine. Le calcium étant toujours présent dans la cellule, ce cycle va se reproduire de nombreuses fois jusqu'à ce que la repolarisation de la cellule fasse abaisser le niveau de calcium intracellulaire. Le calcium sera alors soit expulsé de la cellule soit stocké dans les organites intracellulaires (Figure 7).

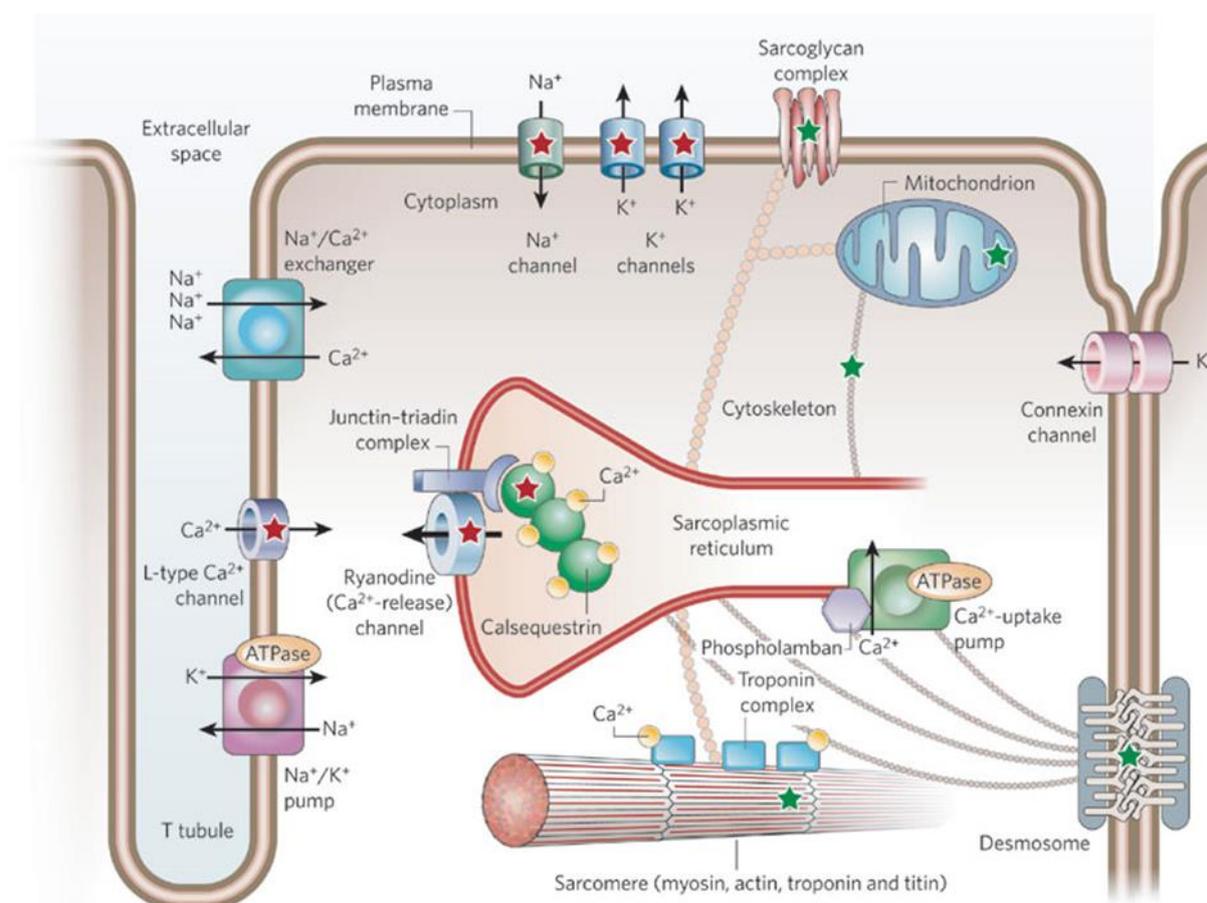


Figure 7 : Schématisation du couplage contraction excitation dans les cardiomyocytes ventriculaires contractiles (Knollmann et Roden 2008).

Introduction générale

Partie 1 : Insuffisance cardiaque

1. Description et origines de l'insuffisance cardiaque

a) Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde avec 17,5 millions de décès, ce qui représente 31% de la mortalité mondiale totale (chiffres extraits du guide « Statistiques sanitaires mondiales 2012 » publié par l'Organisation Mondiale de la Santé). D'après les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires pourrait atteindre 23,6 millions en 2030. Pour entrer dans le détail, on comptabilise 8,14 millions de décès liés aux maladies cardiaques avec en tête les cardiopathies ischémiques et 6,5 millions liés aux accidents vasculaires cérébraux (Figure 8).

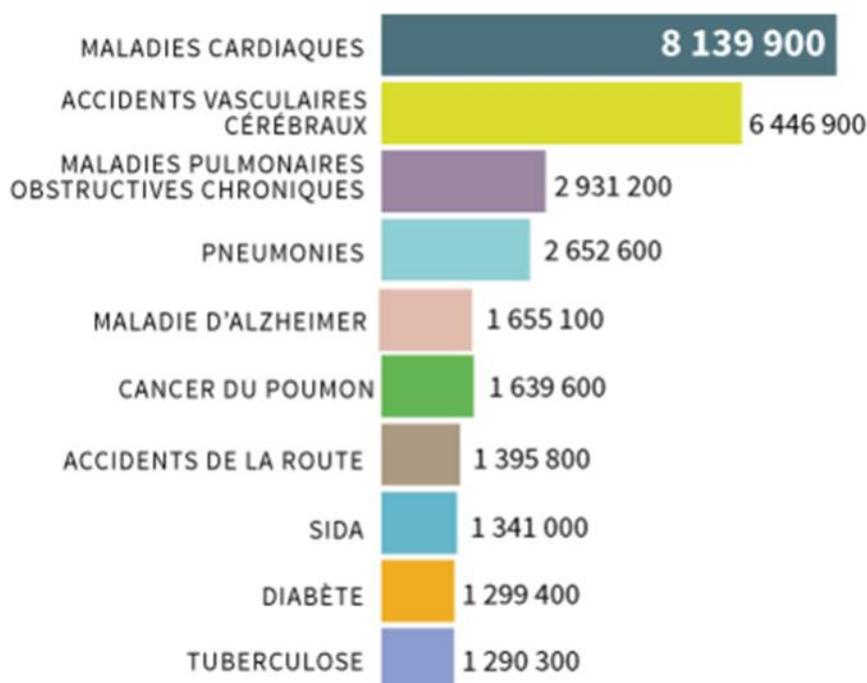


Figure 8 : Histogramme présentant les chiffres des principales causes de décès dans le monde en 2013 (The Lancet).

Selon la Haute Autorité de Santé française, l'insuffisance cardiaque concernerait environ 500 000 français et représente la première cause d'hospitalisation. Sa prévalence est croissante et serait de 12 % chez les personnes âgées de plus de 60 ans. La recherche médicale dans ce domaine a beaucoup progressé et on observe une diminution de 10% des cas d'insuffisance cardiaque en France en 23 ans (en 1990, le nombre de décès liés aux maladies cardiaques étaient de 92 400, ce chiffre est passé à 83 779 en 2013). Cependant la prévalence reste très élevée : 2 à 3% de la population européenne est touchée. Il s'agit donc d'un problème majeur de santé publique.

b) Physiopathologie

L'insuffisance cardiaque correspond à une altération de la fonction cardiaque. Le cœur n'est plus capable d'assurer correctement son rôle de pompe et de répondre aux besoins de l'organisme. Il existe deux formes d'insuffisance cardiaque : aiguë ou chronique (R. C. Davis, Hobbs, et Lip 2000). L'insuffisance cardiaque aiguë survient de manière rapide accompagnée de symptômes sévères, c'est le cas notamment de la crise cardiaque. L'insuffisance cardiaque chronique est plus fréquente et apparaît de manière progressive. Les symptômes surviennent lentement et s'aggravent au fil du temps.

Les origines sont diverses (Katz 2008) :

- Génétique : des mutations dans le gène de la dystrophine, de la lamine A /C ou encore de la desmine, par exemple, peuvent entraîner une cardiomyopathie.
- Hypertension artérielle chronique : augmentation du travail cardiaque induisant un remodelage.
- Surcharge de pression : augmentation du travail cardiaque induisant un remodelage.
- Fuite mitrale ou valvulopathie : le cœur n'éjecte pas correctement le sang entraînant une dilatation progressive.
- Cardiomyopathie : modification de la structure ou de la souplesse (compliance) du cœur.
- Myocardite (inflammation cardiaque) : inflammation causée généralement par une infection virale.
- Occlusion vasculaire (infarctus du myocarde) ou coronaropathie : blocage physique d'un vaisseau sanguin induisant une pénurie en oxygène et en nutriments à l'origine de la perte de cardiomyocytes.
- Consommation d'alcool ou de drogue : ces substances ont un effet cardiotoxique en détruisant des cellules cardiaques.
- Malformation cardiaque congénitale : une malformation du cœur ou des cavités peuvent perturber sévèrement la circulation sanguine.
- Pneumopathie : une maladie pulmonaire peut réduire considérablement l'apport en oxygène et donc augmenter le travail cardiaque.

Concernant les pathologies cardiaques associées à des troubles du rythme (dysfonctionnement des canaux ioniques entraînant des anomalies de conduction auriculo-ventriculaire), il existe, entre autres, les syndromes du QT long (SQTL) et les tachycardies ventriculaires catécholinergiques (TVC), le syndrome de Brugada et les fibrillations atriales.

Il existe différentes formes de cardiopathie : cardiomyopathie dilatée (ou CMD), cardiopathie hypertrophique (ou CMH) et dysplasies ventriculaires droites arythmogènes (DVDA).

La pathologie cardiaque s'installe de manière progressive : dans un premier temps le cœur arrive à compenser et à maintenir une fonction cardiaque normale mais si le remodelage persiste il devient délétère et l'insuffisance chronique s'installe. Une des principales causes de l'évolution d'un évènement traumatique en insuffisance cardiaque est liée à la très faible capacité de régénération du cœur (*cf Régénération cardiaque, page 27*).

2. La cardiomyopathie dilatée

La cardiomyopathie dilatée (CMD) se traduit par une dilatation principalement du ventricule gauche associée à une anomalie de la fonction diastolique puis systolique aboutissant à une insuffisance cardiaque sévère (Hershberger et Morales 1993). La CMD touche principalement l'adolescent ou le jeune adulte et se caractérise par une dyspnée d'effort (Jefferies, Hoffman, et Nelson 2010). La principale complication de la maladie est une insuffisance cardiaque réfractaire entraînant une mort subite dans 30 à 50% des cas sur 5 ans. C'est la première indication de greffes cardiaques. Malgré une prévalence de 1 cas sur 2500, peu d'études ont été menées sur la recherche de traitement dans le cadre de la CMD.

Les origines de la CMD sont diverses : génétiques, toxicologiques (drogue, alcool ou chimiothérapie anticancéreuse), métaboliques (hyperthyroïdie), infectieuses (agression virale) ou immunitaires (production d'anticorps dirigés contre les cardiomyocytes). D'un point de vue génétique, dans 75% des cas, la CMD est sporadique et multifactorielle et dans 25% des cas, elle est familiale et monogénique (Schönberger et Seidman 2001). C'est une pathologie très hétérogène : beaucoup de protéines peuvent être impliquées (protéines du cytosquelette, de la membrane nucléaire, du sarcomère ou impliquée dans le métabolisme calcique). Les protéines du sarcomère et du cytosquelette sont les plus touchées (Fatkin et Graham 2002). Les cardiomyocytes, ayant un dysfonctionnement génétique, entrent alors en apoptose. La perte de matériel contractile induit alors un étirement des cellules ce qui provoque une augmentation du diamètre en fin de diastole : le cœur se dilate entraînant alors une augmentation de la post-charge et une surcharge de débit. Dans un premier temps, le cœur entre dans une phase d'hypertrophie compensatrice de type excentrique qui est temporaire (*Figure 9*). Le diamètre du myocarde augmente en longueur. Avec le temps, l'apoptose perpétuelle des cardiomyocytes ainsi que la diminution de l'efficacité des mécanismes d'adaptation cellulaire induisent un remodelage délétère. L'angiogenèse est stoppée tandis que la fibrose se développe. Il y a également une réexpression du phénotype fœtal. La paroi ventriculaire s'amincit, notamment le ventricule gauche qui participe à la circulation systémique. L'altération de la fonction systolique marque le début de l'insuffisance cardiaque (Haq et al. 2001).

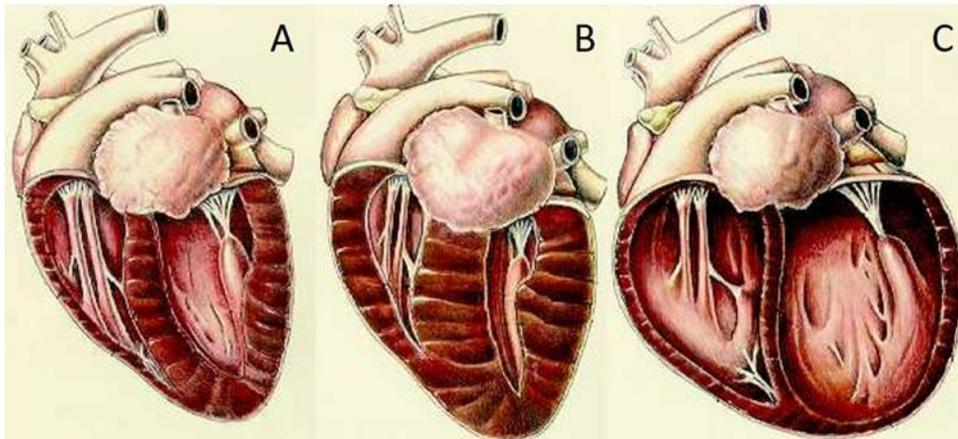


Figure 9 : Représentation schématique du remodelage cardiaque aboutissant à la cardiomyopathie dilatée : début du processus de remodelage (A), étape d'hypertrophie compensatrice transitoire (B), remodelage final : dilatation des cavités ventriculaires (C).

3. L'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde, autrement appelé crise cardiaque, est lié à une occlusion vasculaire. Le déficit en oxygène et en nutriments entraîne la perte rapide d'une partie du tissu cardiaque qui était irrigué par le vaisseau. La conséquence directe est la perte de fonction dans la zone infarctée, entraînant une baisse de la contraction cardiaque. Si la zone infarctée n'est pas irriguée de nouveau, elle va se nécroser de manière irréversible entraînant le dépôt d'un tissu fibreux pour combler les brèches tissulaires. Le tissu fibreux n'étant pas constitué de cellules cardiaques capables de transmettre l'activité électrique, des troubles du rythme apparaissent. Il existe différentes causes de l'occlusion vasculaire mais une des causes majeures est l'athérosclérose (Boudoulas et al. 2016). L'athérosclérose correspond à la formation d'une plaque d'athérome à l'intérieur du vaisseau. Cette plaque est constituée entre autres de macrophages ayant phagocyté une grande quantité de lipides liés au cholestérol. Quand cette plaque est de taille conséquente, le risque qu'elle se détache est très élevé causant de graves conséquences. Cependant dans la majorité des cas, l'augmentation de la taille de cette plaque entraîne la réduction du diamètre du vaisseau dans lequel elle se trouve. Quand cette taille est insuffisante pour maintenir une circulation sanguine optimale, l'infarctus apparaît. Une alimentation riche en lipides associée à une hypertension artérielle et une sédentarité correspondent aux principaux facteurs à risque d'apparition de l'infarctus du myocarde. Une prédisposition génétique, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, une embolie coronaire, une sténose mitrale ou aortique sont également à l'origine de l'occlusion vasculaire.

4. Adaptation cardiaque et remodelage

a) Remodelage bénéfique

En cas d'insuffisance cardiaque, le muscle cardiaque n'éjecte pas assez de sang pour maintenir une circulation sanguine adéquate. Pour retrouver un débit cardiaque correct, le cœur peut s'adapter de trois manières différentes (Gaertner et al. 2004) : 1) la fréquence cardiaque augmente pour retrouver une vitesse de circulation sanguine

correcte, 2) le volume cardiaque augmente pour contenir plus de sang, 3) le muscle cardiaque s'épaissit afin de d'augmenter la puissance de la contraction cardiaque. Le remodelage du cœur regroupe l'ensemble des étapes au cours desquels le cœur va répondre, suite à un évènement traumatique, pour tenter de retrouver un fonctionnement cardiaque normal. Ce remodelage est dans un premier temps bénéfique car il fait intervenir des voies de signalisation cardiaque bénéfique. Ce type de remodelage reste bénéfique tant qu'il est temporaire. Il est présent par exemple chez le sportif ou la femme enceinte. Quand le stimulus à l'origine du remodelage se prolonge dans le temps, les mécanismes adaptatifs s'épuisent et le remodelage devient alors délétère pour le cœur. Pour entrer dans les détails, l'exemple qui a été le plus étudié dans la littérature est celui de l'occlusion coronaire aiguë : l'infarctus du myocarde (*Figure 10*).

Phase I : La phase aiguë correspond aux premières minutes qui suivent l'occlusion vasculaire. Durant cette phase, la circulation est stoppée entraînant l'apparition de la zone infarctée correspondant à la nécrose du tissu cardiaque. La nécrose est accompagnée d'un œdème tissulaire et de l'infiltration de cellules inflammatoires : neutrophiles et macrophages qui vont phagocyter les myocytes nécrosés et activer les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T. Ce tissu nécrotique produit beaucoup de cytokines qui vont stimuler les fibroblastes cardiaques et les pousser à la prolifération et à la transdifférenciation en myofibroblastes. Les fibroblastes et les myofibroblastes vont synthétiser une quantité importante de collagène fibrillaire (Type I et III) pour former une nouvelle matrice extracellulaire et combler les brèches tissulaires laissées par la perte de cardiomyocytes. Du collagène non-fibrillaire est également produit (type IV et VI) afin d'aider à l'organisation du réseau de fibrose. Le tissu fibreux joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité tissulaire du myocarde (homéostasie myocardique) et évite au ventricule une trop forte dilatation et/ou une rupture de la paroi cardiaque. Les métalloprotéases (ou MMPs) sont des enzymes, produites par les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques, permettant la dégradation de la matrice extracellulaire du myocarde. Le remodelage cardiaque dépend donc de la balance entre la synthèse et la dégradation de ces protéines.

Un mois après l'infarctus, la cicatrice fibreuse est complètement formée. Elle permet de stabiliser la zone infarctée, cependant la fibrose est un tissu très dense qui n'a pas la capacité de se contracter ce qui va entraîner des perturbations cardiaques. Les zones du myocarde qui n'ont pas été touchées par l'infarctus doivent augmenter leur travail pour répondre à cette perte de contractilité. Pour cela, les myocytes vont augmenter leur taille de manière hypertrophique (étirement des myocytes pour augmenter leur contractilité), les cellules non-musculaires vont s'hyperplasier et de la fibrose interstitielle va s'installer. Au cours de la phase aiguë, la perte brutale de cardiomyocytes entraîne une diminution de la fonction cardiaque avec une dilatation du ventricule gauche. Les contraintes pariétales en systole et en diastole augmentent

car le rayon du cœur augmente ($\sigma = kPr/e$ avec σ =contraintes pariétales, P =pression dans le ventricule, r =rayon du cœur, e =épaisseur de la paroi myocardique). Pour maintenir une pression artérielle normale, le système neuro-hormonal est activé (catécholamines et système rénine-angiotensine-aldostérone).

Phase II : Une fois que tous ces mécanismes adaptatifs sont mis en place, le cœur compense la perte des cardiomyocytes et maintient de bons paramètres cardiaques. Le système neuro-hormonal revient à la normale ainsi que les contraintes pariétales. C'est le remodelage compensé ou remodelage bénéfique. Malgré un retour à la normale des paramètres cardiaques, l'occlusion vasculaire persiste et le remodelage myocardique continue.

b) Remodelage délétère

Phase III : Selon la taille de la zone infarctée le cœur peut compenser dans un premier temps, en revanche, si la dilatation ventriculaire et la pression artérielle persistent, le remodelage devient délétère et l'insuffisance cardiaque s'installe. Pour corriger la dilatation ventriculaire, un nouveau processus de remodelage se met en place avec réactivation du système neuro-hormonal et une hausse des contraintes pariétales. Le travail mécanique cardiaque demandé aux myocytes s'intensifie de nouveau ce qui augmente la fatigue cardiaque et altère de plus en plus la fonction contractile. De plus, l'expansion de la cicatrice cardiaque perdure car la perte de cardiomyocytes continue même après l'infarctus. L'insuffisance cardiaque devient chronique et peut aboutir à plus ou moins long terme au décès des patients.

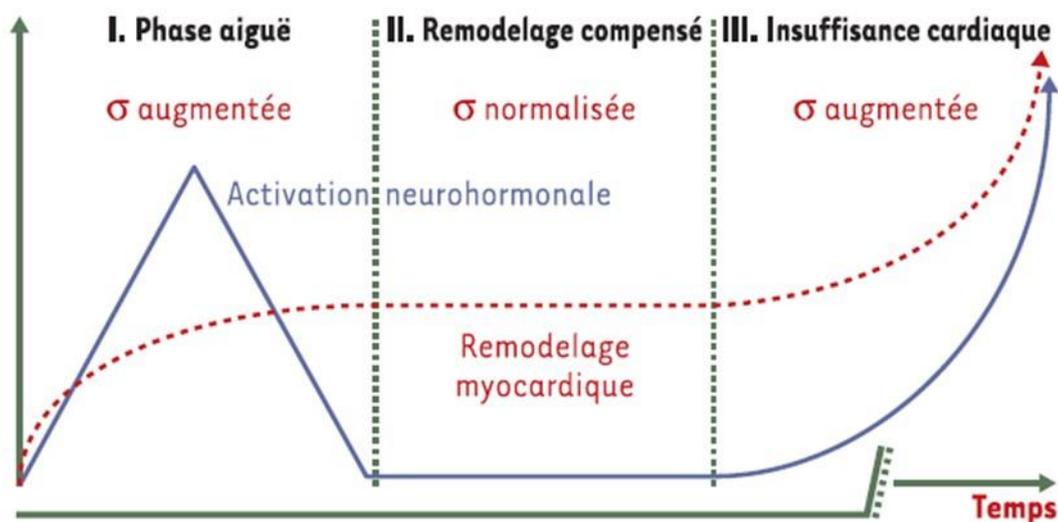


Figure 10 : Représentation graphique des différentes étapes de remodelage cardiaque suite à un infarctus (Gaertner et al. 2004).

Considérant la complexité de la structure cardiaque et du remodelage post-ischémique, un traitement adapté doit associer un aspect moléculaire et cellulaire, ainsi que pharmacologique et chirurgical afin de 1) réduire la perte de cardiomyocytes, 2) revasculariser la zone nécrosée, 3) prévenir un remodelage délétère et 4) préserver

et restaurer une fonction cardiaque normale. Pour éviter la dilatation du ventricule, il faut agir le plus rapidement possible en diminuant la durée d'ischémie (réouverture du vaisseau bouché par un ballonnet) afin de réduire au maximum la zone infarctée et ainsi donner plus de chance de survie au patient.

5. Régénération cardiaque

Contrairement aux organes comme le foie, le muscle et la peau, le cœur adulte est un organe qui possède une capacité de régénération très limitée. Trois processus principaux interviennent pour réparer le cœur (*Figure 11*) : 1) la prolifération de cardiomyocytes, 2) le recrutement de nouvelles cellules provenant principalement de la moelle osseuse ou 3) l'activation de cellules souches résidentes du cœur. L'objectif de ces mécanismes est le remplacement des cellules musculaires cardiaques en cas de perte induite par une pathologie cardiaque. Ces nouvelles cellules doivent permettre au myocarde de maintenir une fonction cardiaque suffisante pour oxygéner l'ensemble des tissus de l'organisme.

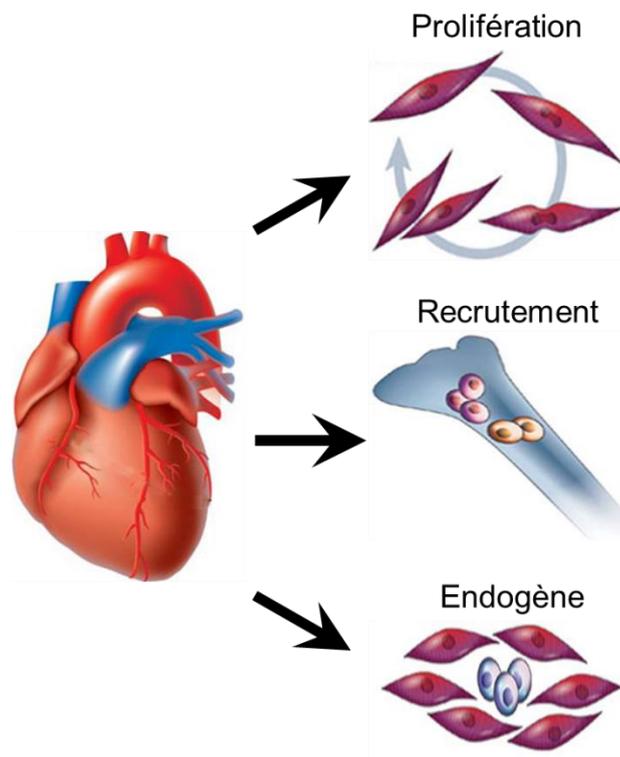


Figure 11 : Schéma des principaux mécanismes impliqués dans la régénération cardiaque.

a) Prolifération des cardiomyocytes

Le premier mécanisme activé en cas de perte de cellules cardiaques est la prolifération des cardiomyocytes existants. Des études ont montré que le cœur de mammifère était capable de régénérer par prolifération des cardiomyocytes. Cependant cette prolifération est capable de combler une brèche cardiaque uniquement durant les premiers jours de vie (Porrello et al. 2011). Dans cette étude, une partie du cœur de souris nouveau-né a été coupé quelques jours après la

naissance. 21 jours après la résection apicale, la brèche a été comblée entièrement par des cardiomyocytes. L'analyse de la prolifération cellulaire a permis de mettre en évidence qu'une prolifération des cardiomyocytes est possible seulement si la brèche cardiaque est causée dans les 7 premiers jours de vie de l'animal. Après ce délai, la capacité de prolifération est considérablement réduite.

b) Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

Le second mécanisme présent pour permettre la régénération cardiaque est le recrutement de nouvelles cellules issues de la moelle osseuse. En effet, chez l'adulte, pour la première fois, la présence de cardiomyocytes dérivés des cellules précurseurs de la moelle osseuse a été démontrée. Après une transplantation de cellules de moelle osseuse par des donneurs de sexe masculin, les cœurs de plusieurs femmes, possédant à l'origine des cellules cardiaques porteuses du chromosome X, ont présenté plusieurs cellules cardiaques porteuses du chromosome Y (Deb et al. 2003). La moelle osseuse est donc une source de progéniteur cardiaque en dehors du cœur capable de produire des cardiomyocytes *de novo*. Le recrutement de progéniteurs cardiaques est possible mais peu efficace. Le pourcentage de cellules qui se renouvelle est très controversé (entre 0 et 20% selon certaines études) et dépend du sexe et de l'âge de la personne concernée (Kajstura et al. 2010).

c) Les cellules souches résidentes du cœur

Le cœur possède des cellules souches endogènes qui participent à la régénération mais leur implication et leur résistance restent limitées (Urbanek et al. 2006). Ces cellules sont décrites plus en détail page 32.

6. Traitements de l'insuffisance cardiaque

La perte massive de tissu cardiaque, observée dans la majorité des cardiopathies, ne peut pas être compensée par les mécanismes cités précédemment. C'est pourquoi la zone non fonctionnelle est remplacée par du tissu fibreux rigide sans fonction contractile. Pour améliorer la régénération cardiaque et réduire la progression des cardiopathies vers l'insuffisance cardiaque, différents traitements pharmacologiques et chirurgicaux sont actuellement proposés aux patients. Cependant un apport au cœur de nouvelles cellules ayant un potentiel cardiogénique pourrait permettre de pallier cette faible capacité de régénération cardiaque.

a) Traitements classiques

Afin de traiter correctement l'insuffisance cardiaque, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été mises en place prenant différentes formes : la réadaptation cardiovasculaire, des traitements pharmacologiques et des interventions chirurgicales. Le premier traitement proposé est la réadaptation cardiaque qui consiste à changer le mode de vie du malade par l'apport d'une alimentation équilibrée, l'arrêt du tabagisme et une activité sportive régulière. L'activité sportive permet au cœur de se remuscler

et d'activer les mécanismes de remodelage bénéfique ainsi que l'amélioration de la respiration et de la circulation sanguine.

Les thérapies pharmacologiques couramment utilisées sont les suivantes :

- Les dérivés nitrés donneurs de monoxyde d'azote (NO) : réduction des pressions artérielles et ventriculaires.
- Les bêtabloquants : réduction de la pression artérielle et protection du cœur contre les effets néfastes à long terme de l'adrénaline et de la noradrénaline.
- Anticoagulant : facilite la circulation sanguine en fluidifiant le sang.
- Vasodilatateurs : dilatation des vaisseaux sanguins pour faciliter la circulation sanguine.
- Inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) : cette inhibition empêche l'enzyme de cliver l'angiotensine I en angiotensine II. L'angiotensine II est un vasoconstricteur puissant. Son blocage diminue la pression artérielle.
- Diurétiques : aident à réduire les congestions et œdèmes qui fatiguent encore plus le cœur.
- Digitaliques : réduction des œdèmes et du rythme cardiaque surtout en cas de troubles du rythme (fibrillation auriculaire).
- Statines : baisse du taux de cholestérol à l'origine de l'occlusion vasculaire.

Différents traitements chirurgicaux peuvent également être proposés aux patients :

- Réouverture coronaire : en cas d'occlusion coronaire, un ballonnet est placé dans le vaisseau puis gonflé pour libérer la lumière du vaisseau. Un stent peut également être placé afin d'éviter une resténose vasculaire.
- Pause d'un pacemaker ou stimulateur cardiaque : surveillance de la fréquence cardiaque et envoi une impulsion électrique pour relancer le cœur en cas de ralentissement.
- Défibrillateur automatique implantable : stimulation électrique en cas d'arrêt cardiaque.
- Resynchronisation cardiaque (CRT) : stimulation cardiaque en cas de ralentissement mais également synchronisation du ventricule gauche avec le ventricule droit.
- Assistance ventriculaire gauche (AVG) : en cas d'insuffisance cardiaque très avancée, l'AVG permet de pomper le sang « à la place » du ventricule gauche. Le patient devient alors dépendant de la machine. Cette solution est temporaire en attente de la greffe.
- Transplantation cardiaque (ou greffe) : pour certains patients ne répondant plus aux traitements médicamenteux et dont l'insuffisance cardiaque est devenue trop sévère, le remplacement de tout le cœur est nécessaire. Une greffe est alors nécessaire mais avec la pénurie de greffon, l'attente d'un nouveau cœur peut prendre des années et contraindre le patient à rester hospitalisé.

b) Nouveaux traitements

Malgré les avancées thérapeutiques de ces 20 dernières années et l'arsenal thérapeutique disponible, la recherche de nouveaux traitements pour soigner l'insuffisance cardiaque est encore nécessaire.

Thérapie génique : Développée initialement pour le traitement de maladies rares d'origine génétique telle que la dystrophie musculaire de Duchenne, la thérapie génique, dont l'objectif est de rétablir l'expression du gène anormal via un vecteur, est actuellement en cours de développement pour traiter l'insuffisance cardiaque. Deux essais cliniques sont en cours : le premier pour réguler le calcium cardiaque par administration du gène SERCA 2a via un vecteur AAV1 par voie intracoronaire (essai CUPID - (Jessup et al. 2011)), et le second concernant l'administration du gène SDF-1 par injections endomyocardiques d'un plasmide pour soigner les patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère (essai STOP-HF – (Chung et al. 2015)).

Nouveau médicament : ENTRESTO® (ou LCZ696) est un nouveau médicament pour traiter l'insuffisance cardiaque qui combine un blocage des récepteurs de l'angiotensine II associé à une inhibition de l'enzyme néprilysine. Ce médicament permet de réduire les effets nocifs de l'angiotensine II tout en améliorant les systèmes de protection neuro-hormonale du cœur. D'après une étude, ce médicament permettrait de réduire de 20% la mortalité (Morrow 2015).

Le cœur artificiel : Les dispositifs d'assistance ventriculaire permettent d'aider le ventricule gauche à éjecter le sang cependant il faut que le ventricule droit fonctionne correctement. En cas d'insuffisance cardiaque des deux ventricules, aucune machine n'était jusqu'alors capable de remplacer l'ensemble du cœur. En 1982, la première machine Jarvik 7 (ou CardioWest) permettant de remplacer complètement le cœur a été implantée chez l'Homme. On parle de cœur artificiel. Différents cœurs artificiels totaux ont par la suite été développés (Copeland et al. 2000). Depuis 2001, le prototype de cœur total en plastique et titane AbioCor est en cours de test aux Etats-Unis et depuis 2008, le premier cœur artificiel biocompatible et auto-régulé, développé par la société Carmat, est en cours d'essai clinique en France (Latrémouille et al. 2015). Ces dispositifs médicaux permettraient aux patients en attente d'une greffe de continuer de mener une vie normale en dehors de l'hôpital.

Thérapie cellulaire pour régénérer le tissu cardiaque : La pénurie de greffon est un réel obstacle dans la prise en charge des patients en état sévère, et s'accompagne d'un risque important de rejet. L'idée de régénérer le cœur sans avoir recours à la transplantation cardiaque permettrait de réduire considérablement la demande en organe. C'est l'objectif de la thérapie cellulaire dont le principe repose sur l'apport de nouvelles cellules fonctionnelles pour permettre au tissu cardiaque de retrouver une contractilité normale.

Partie 2 : Thérapie cellulaire cardiaque

1. Principe de la thérapie cellulaire

Selon l'article L1211-1 du code de la Santé Publique, « la thérapie cellulaire concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparation de cellules vivantes humaines ou animales ». Elle a pour objectif la réparation des tissus endommagés par une maladie ou un dysfonctionnement physiologique. Dans le cadre des maladies cardiaques, le but est d'améliorer la fonction contractile en stimulant les voies de réparation endogène ou en régénérant le matériel contractile du myocarde via l'apport de nouvelles cellules. Lorsque l'on parle de thérapie cellulaire cardiaque, deux questions essentielles se posent :

- 1) Quels types cellulaires utiliser pour favoriser la régénération cardiaque ?
- 2) Quelles méthodes utiliser pour apporter les cellules choisies au myocarde ?

2. Les sources de cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque

De nombreux types cellulaires ont été testés dans une optique de thérapie cellulaire cardiaque. Des études ont montré que les cellules souches ont le potentiel de participer à la régénération cardiaque (P. Menasché et Vanneaux 2016). Ces cellules sont considérées comme ayant le potentiel le plus intéressant pour des approches de thérapies cellulaires, surtout en considérant leur capacité régénérative. Les récents développements concernant l'obtention de cardiomyocytes dérivées des cellules souches pluripotentes laissent entrevoir des opportunités jusqu'ici insoupçonnées. Ainsi, les cellules souches sont au centre des stratégies actuellement en développement dans le domaine cardiaque.

Cependant, la cellule pourrait être très certainement considérée comme l'un des médicaments les plus complexes qui soient. Cette complexité reste cependant à la hauteur de la complexité des mécanismes de régénération, et plus spécifiquement de la régénération myocardique. De plus, il faut cependant mettre en perspective la complexité cellulaire avec celle d'un organe entier tandis que le contexte clinique actuel considère la greffe d'organe comme le traitement le plus efficace en cas d'insuffisance cardiaque terminale.

a) La cellule souche : définition

Une cellule souche se définit comme étant une cellule indifférenciée ou faiblement différenciée qui est capable de se diviser et de se différencier en un ou plusieurs types cellulaires. Les cellules souches pluripotentes, par exemple, sont capables de se diviser indéfiniment et de se différencier en tout type cellulaire embryonnaire afin de donner des cellules des lignages de l'ectoderme, du mésoderme ou de l'endoderme. Il existe également des cellules souches adultes, souvent nommées progéniteur, et qui participent à la régénération naturelle des organes, comme les cellules souches du muscle strié squelettique (myoblastes) ou les cellules de la moelle

osseuse qui participent notamment à l'érythropoïèse. De nombreux types de cellules souches ont été considérés pour la thérapie cellulaire cardiaque.

b) Cellules souches adultes

Cellules souches du muscle strié squelettique : Conceptuellement, les cellules musculaires, et notamment les cellules souches du muscle strié squelettique (myoblastes), présentent de nombreux avantages. En effet, ces cellules peuvent présenter un phénotype contractile, et être isolées chez le patient pour une transplantation autologue. Elles sont également résistantes à l'ischémie. Ces cellules ont d'ailleurs fait l'objet des premiers essais cliniques dans le cadre de la régénération cardiaque (P. Menasché et al. 2001). Après injection intra-myocardique, ces cellules se sont différenciées en myotubes mais n'ont pas établi de connexions (jonction gap) avec les cardiomyocytes hôtes. Elles ont tout de même démontré un bénéfice fonctionnel mais pourraient également être à l'origine de l'induction d'arythmies ventriculaires (Hagège et al. 2006).

Cellules mononucléaires autologues : Issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique, les cellules mononucléaires autologues sont les premières à avoir été testées dans des essais exploratoires (Assmus et al. 2002). Cependant lorsque des patients atteints d'infarctus du myocarde ont reçu ces cellules, aucune différence fonctionnelle (évaluation de la fraction d'éjection du ventriculaire gauche) n'a été mise en évidence comparativement au groupe de patients contrôles (Sürder et al. 2013).

Cellules souches mésenchymateuses : Les cellules souches mésenchymateuses possèdent la capacité de se renouveler et de se différencier en différents types cellulaires comme les ostéoblastes, les adipocytes et les chondrocytes (Pittenger et Martin 2004). Elles peuvent être aisément isolées et amplifiées à partir de différents tissus (Keating 2012). De plus, elles possèdent des propriétés immunomodulatrices et peuvent ainsi échapper à la réponse immunitaire (Aggarwal et Pittenger 2005). Pour toutes ces raisons, ces cellules ont fait l'objet de nombreuses études et d'essais cliniques en thérapie cellulaire cardiaque (Choi, Kurtz, et Stamm 2011; Karantalis et Hare 2015). Il y a maintenant suffisamment de preuves que la thérapie cellulaire utilisant les cellules souches mésenchymateuses est sans danger et possède une efficacité encourageante avec ces cellules. Les essais cliniques en cours (en phase 3) permettront de répondre prochainement à la question du bénéfice que ces cellules peuvent offrir aux patients (Bartunek et al. 2013).

Cellules souches résidentes du cœur : Il a été démontré que le cœur adulte avait des capacités de renouvellement et de régénération limitées (Bergmann et al. 2009). Il a ainsi pu être démontré qu'il existe un « pool » de cellules souches résidentes du cœur capables de se différencier en cellules angiogéniques et en cardiomyocytes (Messina et al. 2004). Ces cellules sont isolées via différentes approches comme le tri de cellules Sca-1+ ou c-kit+ ou encore la culture d'explants sous forme de cardiosphères (Gaetani et al. 2014). Plusieurs essais cliniques ont démontré les

bénéfiques encourageants de l'utilisation de ces cellules (Malliaras et al. 2014; Chugh et al. 2012). Cependant ces cellules ont majoritairement un phénotype mésenchymateux et il a été montré, notamment, que les cellules c-kit+ ont un destin principalement vasculaire et non contractile (van Berlo et al. 2014).

c) Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes présentent l'avantage de pouvoir être différenciées en cardiomyocytes fonctionnels à large échelle. Il existe deux types de cellules souches pluripotentes, les cellules souches embryonnaires (ESC) et les cellules souches induites à la pluripotence (iPSC). Ces cellules peuvent être différenciées pour induire la formation de progéniteurs cardiaques ou de cardiomyocytes.

Les cellules souches embryonnaires (ESC) : Les ESC proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste (premier stade embryonnaire). Ces cellules expriment les marqueurs de pluripotence Oct4, Nanog et Sox2 et peuvent induire la formation de tératomes après injection dans le cœur (Nussbaum et al. 2007). Ces cellules provenant des embryons sont des cellules capables de donner tous les types cellulaires embryonnaires. En revanche, ces cellules posent un problème éthique non-négligeable du fait de leur provenance embryonnaire. Cependant, des cellules cardiaques dérivées de ESC ont été évaluées pour leur capacité en thérapie cellulaire cardiaque. Il a ainsi été montré que ces cellules pouvaient participer à la remuscularisation du myocarde et être couplées de manière électro-mécanique aux cellules de l'hôte (Blin et al. 2010 ; Chong et al. 2014). Un essai clinique, conduit par le Pr. Menasché est actuellement en cours pour évaluer la sécurité d'utilisation de ces cellules (essai clinique ESCORT (Philippe Menasché et al. 2015)).

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) : En 2007, Yamanaka (Takahashi et al. 2007) a démontré qu'il était possible de reprogrammer des cellules adultes en cellules souches pluripotentes. Les iPSC ont de nombreux points communs avec les ESC (Mallon et al. 2014). Il ne s'agit donc pas de cellules souches adultes mais bien de cellules souches pluripotentes qui expriment les marqueurs Oct4, Nanog et Sox2. Ces cellules peuvent être obtenues à partir de n'importe quel type de cellules adultes bien que la plupart du temps la reprogrammation est faite à partir de fibroblastes de la peau, de cellules mononucléées sanguines ou encore de cellules urinaires (Lewandowski et Kurpisz 2016). Ces cellules font également l'objet d'une intense évaluation pour leur utilisation en thérapie cellulaire cardiaque. L'utilisation de ces cellules pose la question de leur sécurité pour une application clinique du fait du processus de reprogrammation qui implique une modification génétique. Ainsi, le premier essai clinique utilisant ces cellules au Japon a été arrêté suite à la découverte d'une mutation dans les cellules du deuxième patient après la reprogrammation. Les progrès attendus dans ce domaine devraient permettre de dépasser ces problèmes afin d'envisager un essai clinique dans le domaine cardiaque.

d) Reprogrammation directe ou transdifférenciation

Des études de preuve de concept ont démontré qu'il était possible de reprogrammer directement des cellules somatiques adultes en cardiomyocytes. Ainsi, des fibroblastes humains ont été transdifférenciés en cardiomyocytes (Islas et al. 2012). Cependant, les protocoles actuels ont une très faible efficacité comparativement avec les protocoles de différenciation cardiaque à partir de cellules souches pluripotentes. De plus ces cellules ne sont pas encore totalement caractérisées et des publications indiquent qu'elles ont un stade de maturation équivalent à des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes tandis que d'autre indiquent qu'elles sont moins matures (Nam et al. 2014; Wada et al. 2013). Cette approche doit cependant être améliorée avant d'être envisagée dans des protocoles de thérapie cellulaire.

3. Choisir les cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque

Les cardiomyocytes adultes sont théoriquement les meilleures cellules pour régénérer le myocarde pathologique. Ainsi dans les années 1990, il a été montré que des cardiomyocytes fœtaux implantés pouvait s'intégrer au tissu cardiaque de l'hôte (Koh et al. 1995). Cependant il n'existe pas de sources de cardiomyocytes humains pouvant être cultivés à grande échelle pour des applications cliniques. De même qu'isoler des cardiomyocytes à partir du patient est une stratégie inopérante du fait de la faible capacité de multiplication de ces cellules et de l'impossibilité de les conserver en culture. Ainsi les investigateurs ont recherché de nouveaux types cellulaires pour la thérapie cellulaire cardiaque (voir sections précédentes de ce chapitre).

Récemment, les avancées dans les systèmes de culture des cellules souches pluripotentes et des protocoles de différenciation (Lian et al. 2012 ; Burridge et al. 2014) ont permis l'obtention de cardiomyocytes humains à partir de cellules aisément cultivés et amplifiées *in vitro*. Ces cellules dérivées à partir d'ESC ou d'iPSC possèdent ainsi les qualités requises pour avancer d'un pas supplémentaire vers la régénération du matériel contractile cardiaque. Suite à ces découvertes, il a été démontré par plusieurs études la supériorité des cellules du lignage cardiaque comparativement aux autres types cellulaires auparavant envisagées comme les cellules mononucléées dérivées de la moelle osseuse, les cellules souches mésenchymateuses ou les myoblastes squelettiques (voir *Tableau 1*).

Cellules cardiaques greffées	Comparaison	Principaux résultats	Référence
Cardiomyocytes dérivés d'ESC	Myoblastes	Fibrose réduite avec les cardiomyocytes dérivés d'ESC	(Ebelt et al. 2007)
Cellules souches cardiaques (Sca-1+)	Cellules souches mésenchymateuses Myoblastes Cellules de la moelle osseuse	Taille de l'infarctus réduit et augmentation de l'angiogénèse avec les cellules souches cardiaques	(Tokunaga et al. 2010)
Cellules souches cardiaques	Cellules souches mésenchymateuses	Meilleure intégration et fonction cardiaque avec les cellules souches cardiaques	(Rossini et al. 2011)
Cardiomyocytes dérivés des iPSC	Cellules souches mésenchymateuses	Fibrose réduite et amélioration de la fonction avec les cardiomyocytes	(Citro et al. 2014)

Tableau 1 : Les différentes études comparatives entre cellules du lignage cardiaque et autre types cellulaires. Inspiré de (P. Menasché et Vanneaux 2016).

Ainsi, la supériorité des cellules de lignage cardiaque est démontrée par une amélioration fonctionnelle plus importante, un meilleur taux de greffe de ces cellules et également une plus forte réduction de la fibrose et de la taille de la zone infarctée. De plus, il a également été démontré que les cellules du lignage cardiaque avaient également de meilleurs résultats en termes de production de facteurs paracrines cardioprotecteurs (Liu et al. 2014).

Le domaine de la thérapie cellulaire cardiaque se tourne donc de plus en plus vers l'utilisation de ces cellules et notamment des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes (ESC ou iPSC), faisant ainsi une boucle avec les premières études démontrant l'intégration cardiaque de cardiomyocytes fœtaux.

4. Cellules dérivées des cellules souches pluripotentes : avantages et inconvénients

La découverte et la maîtrise de la culture des cellules souches pluripotentes (ESC puis iPSC) a permis la révolution de nombreux domaines de la thérapie cellulaire. A partir de ces cellules, il est ainsi possible d'obtenir différents types de cellules du lignage cardiaque, notamment des cardiomyocytes ou des progéniteurs cardiaques. Le débat concernant l'utilisation préférentielles d'un de ces deux types cellulaires en thérapie cellulaire n'est pas tranché.

a) Progéniteurs cardiaques

L'activation séquentielle de certains facteurs de transcription induit la formation du mésoderme, du mésoderme cardiaque, puis des progéniteurs cardiaques et enfin des cardiomyocytes *in vivo*. Les protocoles les plus efficaces pour obtenir ces cellules à partir d'ESC ou d'iPSC miment ces différentes étapes (*Figure 12*). Assez récemment, l'équipe de Keller a démontré que les cellules du mésoderme cardiaque co-expriment les marqueurs KDR (récepteur de domaine kinase) et PDGFR α (récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes). Ces cellules, une fois triées,ensemencées et cultivées, se différencient à plus de 80% en cardiomyocytes ce qui en font de bons candidats de progéniteurs cardiaques (Kattman et al. 2011). Un autre marqueur

proposé pour isoler ces progéniteurs cardiaques est le marqueur SSEA-1 également nommé CD15 (Blin et al. 2010). Ainsi, des ESC ou iPSC humaines cultivées pendant 4 jours avec de la BMP2 (10 ng/ml) et un inhibiteur du récepteur au FGF (SU5402, 1 μ M) donnent une population constituée à 50% par des cellules exprimant ce marqueur (CD15+). Cette population de cellules CD15+ peut être triée sur colonne magnétique et exprime des marqueurs de progéniteurs cardiaques comme MESP1, MEF2C, NKX2.5, GATA4, TBX5 et ISL1. Ces cellules peuvent être cultivées et se différencier en cardiomyocytes, en cellules du muscle lisse et en cellules endothéliales ce qui en fait, plus largement, des progéniteurs cardiovasculaires. Pour des cellules murines, cette population correspond à la population CD15- et non CD15+.

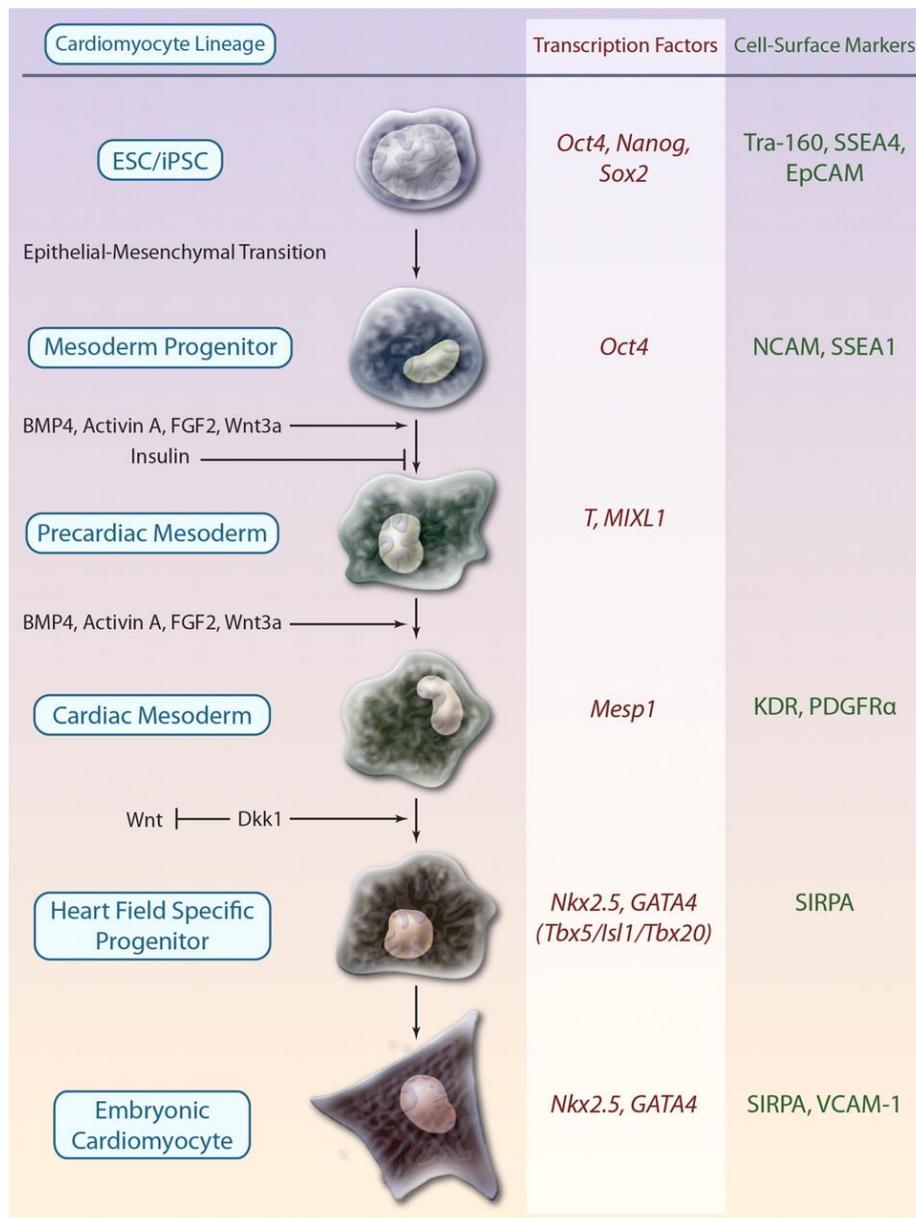


Figure 12 : Modèle séquentiel de la différenciation des cellules souches pluripotentes en cardiomyocytes et/ou progéniteurs cardiaques. Issu de (Mummery et al. 2012).

D'autres approches ont également été utilisées pour obtenir ces progéniteurs, notamment l'utilisation de lignées de cellules génétiquement modifiées qui permettent l'identification et l'isolation de cellules engagées dans la voie cardiaque (Birket et al. 2015).

b) Cardiomyocytes

De la même manière, en dupliquant les étapes du développement cardiaque embryonnaire, l'équipe de Keller a pu mettre au point un protocole d'obtention de cardiomyocytes humains à partir d'ESC (Keller 1995). Depuis cette publication fondatrice du domaine, de nombreuses équipes ont amélioré et fiabilisé ce protocole (Cao et al. 2013 ; Burrige et al. 2014). Ainsi, les protocoles actuels permettent de produire des populations de cardiomyocytes très pures avec une efficacité importante. Il existe deux types d'approches qui permettent d'obtenir des cardiomyocytes : la formation de corps embryoïdes et les monocouches de cellules. Actuellement les protocoles basés sur les monocouches semblent plus efficaces, avec des rendements importants et une grande simplicité. En effet, récemment (Lian et al. 2015), l'équipe de Palecek a publié un protocole basé sur la modulation de la voie Wnt (*Figure 13*). Les ESC ou iPSC humaines sont ainsi cultivées deux jours jusqu'à confluence dans leur milieu de prolifération (comme du mTeSR1 par exemple) sur matrice de matrigel. Puis elles sont cultivées avec un inhibiteur de la GSK3 β (CHIR99021) dans un milieu de différenciation très simple. Cet inhibiteur induit l'activation de la voie Wnt qui va conduire à diriger les cellules vers le mésoderme via l'activation de Brachyury. Trois jours après, les cellules sont ensuite traitées avec un inhibiteur de cette voie Wnt (IWP2) qui va conduire les cellules vers la voie cardiaque. Après culture des cellules dans du milieu de maintenance, les cellules commencent à se contracter spontanément au bout de 7-10 jours après le début du protocole de différenciation, indiquant la formation de cardiomyocytes. Les milieux utilisés dans ce protocole sont très simples, ne contiennent pas de sérum ni de produit d'origine animale et peuvent être aisément transférable pour une utilisation clinique.

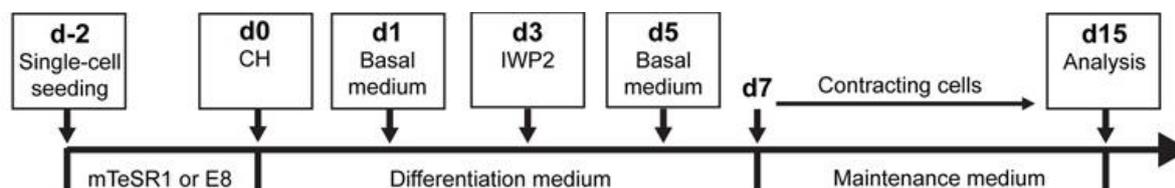


Figure 13 : Protocole récent de différenciation cardiaque (Lian et al. 2015). Basal medium = RPMI 1640 + Progesterone (0,020 μ M) + Putrescine (183 μ M) + Sodium Selenite (0,083 μ M). CH = CHIR99021 (6 μ M). Maintenance medium = RPMI 1640 + Insuline (10 μ g/ml) + Vitamine C (200 μ g/ml).

Il faut noter également que des cardiomyocytes dérivés de cellules souches induites à la pluripotence de patients ont été obtenus, ce qui pourrait permettre de diminuer fortement les risques de rejet (Zhang et al. 2009). Même s'il faut tout de même prendre en compte qu'obtenir des cardiomyocytes à partir de cellules de patients nécessite plus de 3 mois de délai depuis la biopsie jusqu'à l'obtention des

cardiomyocytes. Ces cellules peuvent également présenter un risque de formation de tératomes du fait de la possibilité de persistance de cellules pluripotentes.

Enfin, les cardiomyocytes générés par ces protocoles sont plus proches des cardiomyocytes fœtaux que des cardiomyocytes du cœur adulte. Ainsi, ils sont plus petits, possèdent une excitabilité électrique plus faible (Mummery et al. 2012), ont moins de sensibilité à la stimulation adrénérgique (Pillekamp et al. 2012) et ont un couplage excitation-contraction affaibli (Itzhaki et al. 2006). Cette immaturité pourrait tout de même s'avérer être un avantage pour la thérapie cellulaire cardiaque du fait de la plasticité de ces cellules qui pourrait être plus importante que celle des cardiomyocytes adultes. Cette plasticité pourrait ainsi jouer un rôle prépondérant pour l'intégration des cellules au myocarde malade, le couplage avec les cellules hôte et la résistance aux conditions d'hypoxie et de stress mécanique induites par la greffe.

5. Stratégies d'apport des cellules au myocarde

a) Injections systémiques

La stratégie la plus courante pour apport des cellules est l'injection directe d'une suspension cellulaire dans le myocarde. La méthode la moins invasive consiste à injecter cette suspension dans la circulation systémique au niveau de la crosse aortique en faisant l'hypothèse que les cellules injectées vont pouvoir cibler la zone cardiaque à régénérer. Cependant, cette méthode implique de nombreux obstacles pour les cellules avant de pouvoir coloniser le myocarde. Ainsi, de nombreuses études, dont des études de biodistribution, ont montré que cette méthode est particulièrement inefficace (Chin et al. 2003).

b) Injections intra-coronaires

Une autre stratégie a donc été développée, tenant notamment compte que la plupart des patients atteints d'insuffisance cardiaque subissent une angioplastie coronaire pour revasculariser le vaisseau obstrué. Durant cette intervention chirurgicale, il est ainsi possible d'injecter la suspension cellulaire directement dans la circulation coronaire afin de cibler plus spécifiquement le cœur et la zone infarctée. Malgré cela, les cellules se retrouvent tout de même dans la circulation où elles doivent faire face au flux sanguin. De plus, les cellules doivent également migrer au travers des capillaires cardiaques pour atteindre le myocarde.

c) Injections intramyocardiques

Il est ainsi également possible d'injecter les cellules directement dans le myocarde. Cette approche peut être effectuée de manière peu invasive sous échocardiographie transthoracique guidée ne nécessitant pas l'ouverture sternale ou costale de l'animal. L'avantage de cette technique est que les sites d'injections ne sont pas dépendant de l'anatomie coronaire et qu'elle semble plus directe que les méthodes précédentes. Cependant, les cellules injectées peuvent se retrouver dans

un environnement peu propice comme la cicatrice fibreuse qui se forme après l'infarctus du myocarde.

d) Désavantage de l'injection

Dans une étude comparative de ces deux dernières techniques d'injection (van der Spoel et al. 2012), il n'a pas été montré de différences significatives de rétention des cellules entre ces deux méthodes. Environ 12 % des cellules injectées colonisent effectivement le myocarde, le reste des cellules se retrouvant majoritairement disséminé dans la circulation sanguine ou perdu dans la cavité thoracique. La méthode de l'injection apparaît donc comme plutôt inefficace. Ainsi, une étude a montré qu'une large majorité de cellules était perdue suite à la contraction du myocarde et que moins de 15% de taux de prise de greffe pouvait être espéré quel que soit le type cellulaire utilisé (van den Akker et al. 2016). L'anoikis est une forme de mort cellulaire programmée des cellules adhérentes induite par une faible interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire. Les cellules en suspension qui sont injectées sont ainsi susceptibles de mourir par ce mécanisme.

L'utilisation conjointe de transporteurs de cellules en biomatériaux injectables pourrait permettre d'améliorer la rétention des cellules suite à l'injection et de limiter leur mort par anoikis (Li et al. 2016).

e) Greffe épiscopardique

Ces dernières années ont vu se développer un nouveau domaine de recherche à mi-chemin entre la biologie et l'ingénierie : l'ingénierie tissulaire avec l'utilisation de biomatériaux. Les biomatériaux peuvent ainsi être utilisés comme support pour la greffe épiscopardique de cellules. Le principe est de déposer ce biomatériau ou patch, constitué de cellulesensemencées sur ce support, directement sur le myocarde afin de lever les problèmes liés à l'injection directe des cellules. Ainsi, le biomatériau utilisé a pour objectif de créer un environnement adéquat, naturel ou synthétique, pour la survie et la fonction cellulaire. L'efficacité de cette approche a été démontrée en 2009 dans un modèle d'infarctus chez le rat qui comparait la greffe épiscopardique à l'injection intramyocardique (Hamdi et al. 2009). Il a ainsi été montré une plus grande récupération fonctionnelle en utilisant la greffe épiscopardique que par l'utilisation des injections.

6. Les limites de la thérapie cellulaire

En regroupant les différentes études réalisées sur la thérapie cellulaire cardiaque, de nombreuses constatations ont été faites : premièrement, beaucoup de cellules, couramment utilisées en thérapie cellulaire, ont une capacité de différenciation cardiomyogénique limitée. Deuxièmement, la colonisation du myocarde malade, par les cellules transplantées, n'est pas suffisante car près de 90% des cellules meurent ou sont évacuées du myocarde quelques minutes après l'injection. Cependant, une amélioration de la fonction cardiaque est observable dans beaucoup

d'études. En effet, l'implantation des cellules entraîne la production de facteurs paracrines pro-angiogéniques, anti-apoptotiques, de restauration de la matrice, et induisant le recrutement de cellules souches (Gnecchi et al. 2008). Cette sécrétion de facteurs paracrines est également importante pour la différenciation cellulaire (Behfar et al. 2002). Une amélioration de la thérapie cellulaire cardiaque est envisageable en utilisant des cellules ayant un fort potentiel de différenciation cardiomyogénique et en améliorant la survie et la rétention des cellules greffées.

Partie 3 : Biomatériaux pour la greffe épiscopardique

1. Caractéristiques des biomatériaux pour la thérapie cellulaire cardiaque

Les biomatériaux pour la greffe épiscopardique ont émergé depuis quelques années comme étant une solution intéressante pour délivrer des cellules au tissu cardiaque lésé. Pour une fonctionnalité optimale, ces biomatériaux doivent répondre à certaines caractéristiques essentielles :

1. Ils doivent posséder des caractéristiques d'élasticité et de résistance compatibles avec les cycles de contraction/relaxation du myocarde.
2. Ils doivent être biodégradables et les produits de cette dégradation naturelle ne doivent pas être toxiques.
3. Ils doivent être biocompatibles avec les cellules et avec l'organisme dans lequel ils sont implantés.
4. Ils doivent posséder une porosité suffisante pour permettre la diffusion de biomolécules entre le biomatériau et l'organisme hôte et également permettre la formation d'une vascularisation ou angiogénère.

2. Sources des biomatériaux

Un biomatériau est composé d'une ou plusieurs molécules qui s'assemblent pour former une matrice répondant aux caractéristiques décrites dans le paragraphe précédent. Plusieurs types de molécules ont ainsi été étudiés dans ce contexte. Il est possible de classer ces molécules selon leur provenance : synthétique ou naturelle. Parmi les sources naturelles, il est possible de distinguer les biomatériaux issus d'un organe décellularisé des biomatériaux issus de la purification d'une biomolécule. Il faut également faire une distinction, parmi cette dernière catégorie, entre les biomolécules issues de la matrice extracellulaire et les autres types de biomolécules.

a) Biomatériaux synthétiques

Plusieurs biomatériaux synthétiques ont été utilisés pour des applications en médecine régénérative (Lakshmanan, Krishnan, et Sethuraman 2013). Le principal avantage de ces biomatériaux est qu'ils sont facilement obtenus. Ils peuvent également être aisément modifiés et adaptés en fonction des utilisations requises et notamment pour la fabrication de patchs implantables. De nombreux polymères ont ainsi été utilisés comme, par exemple, le poly-éthylène-glycol (PEG, (Dong et al. 2016)), l'acide poly-lactique (PLA, (Caspi et al. 2007)), le poly-caprolactone (PCL, (Spearman et al. 2015)) ou le polyuréthane (PU, (Chiono et al. 2014)). Cependant, la plupart des produits de dégradation de ces biomatériaux synthétiques sont toxiques (Stachelek et al. 2007). De plus, de par leur nature synthétique, ils induisent également une réponse immunitaire importante et une thrombose. Ainsi, l'utilisation de ces biomatériaux peut s'avérer problématique.

b) Matrice décellularisée

A l'opposé des biomatériaux synthétiques, il est possible d'utiliser des matrices décellularisées. Elles sont obtenues par traitement d'un organe avec des détergents afin de supprimer toute trace de cellules et de ne conserver que la matrice extracellulaire dans toute sa complexité et sa richesse (Wainwright et al. 2010). Ce type de biomatériau est ainsi constitué d'un mélange complexe et organisé de collagènes, de laminine, d'élastine et de glycosaminoglycanes. Elles sont parfaitement biocompatibles et non-toxiques. Elles possèdent également des propriétés mécaniques très intéressantes du fait de leur origine et représentent ainsi une approche prometteuse pour la thérapie cellulaire cardiaque. Ce type de matrice est la plus biomimétique, de tous les points de vue, au myocarde d'origine. Il a ainsi été montré que ce type de matrice pouvait être utilisé en combinaison avec des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes pour fabriquer un micro-tissu cardiaque par ingénierie tissulaire cardiaque (Lesman et al. 2010). Malgré ces importantes qualités, ce type de matrice est cependant complexe à obtenir et difficilement applicable en clinique humaine. En effet, le taux de décellularisation est très important pour la qualité finale de la matrice et difficilement contrôlable. De plus cette approche nécessiterait la mise en place d'une filière animale très coûteuse pour l'obtention d'une matrice cardiaque décellularisée de qualité clinique.

c) Biomatériaux naturels

Les biomatériaux naturels présentent de nombreux avantages pour une utilisation en médecine régénérative. Tout d'abord, ils contiennent des protéines et des polysaccharides naturels qui possèdent des domaines d'adhésion cellulaire. Leurs propriétés physico-chimiques peuvent être plus facilement manipulées contrairement aux matrices décellularisées. De plus ils sont biodégradables, non-toxiques et peuvent persister *in vivo* suffisamment longtemps pour promouvoir une intégration tissulaire mais sont aussi dégradés suffisamment rapidement pour faire place à un tissu régénéré fonctionnel (M. E. Davis et al. 2005). La fibrine (générée à partir de la polymérisation du fibrinogène isolé du plasma sanguin (Christman et al. 2004)), le chitosane (polysaccharide composant la carapace des crustacées par exemple, (Reis et al. 2012)), l'alginate (polysaccharide obtenu à partir de l'algue brune, (Ruginov, Leor, et Cohen 2011)) et l'agarose (polysaccharide obtenu à partir de l'algue rouge, (Yang et al. 2012)) font partie de ces biomatériaux naturels qui ont été utilisés dans des études d'ingénierie tissulaire cardiaque ou de thérapie cellulaire cardiaque.

Des matrices de fibrines ont été utilisées pour améliorer la survie et le taux de prise de greffe des cellules pour des applications en thérapie cellulaire cardiaque. Des cellules souches dérivées du tissu adipeux ont été utilisées en combinaison avec de la fibrine et ont démontré une amélioration fonctionnelle dans un modèle d'infarctus du myocarde (Sun et al. 2014). Pareillement, des résultats très similaires ont été obtenus avec des progéniteurs cardiaques (Guo et al. 2011). Des polysaccharides ont également été utilisés pour des applications très proches et ont montré, par exemple,

que des cellules souches dérivées du tissu adipeux encapsulées dans de l'alginate amélioreraient la rétention et la survie des cellules greffées (Gomez-Mauricio et al. 2013).

d) Biomatériaux issus de la matrice extracellulaire

Des biomatériaux issus de la matrice extracellulaire semblent être le compromis idéal. En effet, ce sont des composés naturels qui possèdent intrinsèquement une activité biologique de support cellulaire, promouvant l'adhésion cellulaire, la survie et la différenciation. Ils sont totalement biocompatibles et sont dégradés par protéolyse en composés non-toxiques. Ils se rapprochent donc de la matrice décellularisée tout en étant moins complexes et plus simples à modifier. Ces biomatériaux sont composés de protéines de la matrice extracellulaire purifiée comme le collagène, la laminine, la fibronectine ou la vitronectine. Il a ainsi été démontré que l'utilisation de collagène comme transporteur cellulaire permettait de réduire la dispersion des cellules injectées (Dai et al. 2009). De plus, la délivrance d'un patch en collagène cellularisé avec des cellules souches mésenchymateuses, permet, après la greffe épiscopardique, d'améliorer la fonction cardiaque et l'angiogénèse (Maureira et al. 2012). Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules souches dérivées du tissu adipeux (Araña et al. 2014).

3. Structure et formulation des biomatériaux pour la thérapie cellulaire cardiaque

Les biomatériaux offrent la possibilité de créer un tissu fonctionnel permettant de réparer le tissu malade. Pour cela, différentes formulations ont été évaluées : monocouche (ou feuille) de cellules, hydrogel injectable ou implantable, microparticules, ou encore structure mimant la matrice extracellulaire (*Figure 14*).

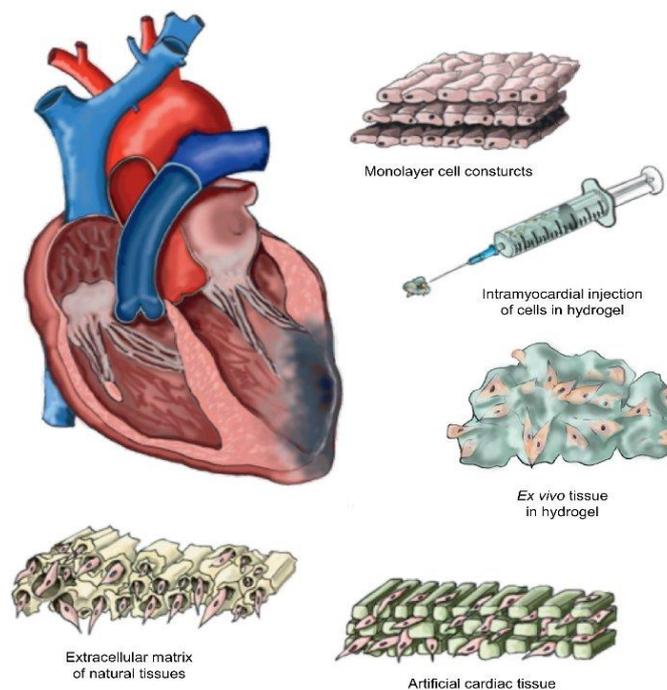


Figure 14 : Illustration de la greffe épiscopardique à partir de différentes formulations de biomatériaux.

a) Feuille de cellules

Les feuilles de cellules ne sont pas des biomatériaux à proprement parler puisqu'il s'agit d'une construction cellulaire. Une introduction au sujet des feuilles de cellules est détaillée dans le *Chapitre 2*.

b) Hydrogels

Les hydrogels sont constitués d'un réseau de polymères organisés en trois dimensions dans une solution aqueuse. Ils sont ainsi principalement constitués d'eau, miment le réseau tridimensionnel de la matrice extracellulaire et reproduisent, plus ou moins fidèlement, un environnement naturel. Les hydrogels peuvent être utilisés par injection ou par dépôt épiqueardique car il est possible de contrôler la gélification au moment de l'utilisation. L'administration d'hydrogel à partir de molécules synthétiques a ainsi démontré un intérêt dans le cadre de la thérapie cellulaire en améliorant la fonction cardiaque et en réduisant l'expansion de la cicatrice fibreuse (Kadner et al. 2012).

Cependant des hydrogels ayant des propriétés plus proches de la matrice extracellulaire peuvent sembler plus intéressants. Ainsi, l'utilisation d'hydrogels de collagène (Gelfoam) améliore la survie de cardiomyoblastes H9C2 greffés dans un modèle d'infarctus chez le rat (Kutschka et al. 2006) et conduit à une amélioration fonctionnelle. Une étude similaire (Kofidis et al. 2005) menée avec des hydrogels de collagène de type I et des cellules souches embryonnaires a démontré des résultats positifs sur la fonction cardiaque (fraction de raccourcissement).

La fibrine est également un hydrogel d'origine naturelle. Elle a été utilisée dans de nombreuses études de thérapie cellulaire cardiaque. Récemment nous avons ainsi démontré que l'apport de progéniteurs cardiaques inclus dans un hydrogel de fibrine permettait, suite à la greffe épiqueardique, une amélioration fonctionnelle à long terme dans un modèle d'infarctus chez le rat (Bellamy et al. 2015). Pour une application clinique ce patch de fibrine et de progéniteurs cardiaques dérivés des cellules souches pluripotentes humaines est greffé chez l'Homme entre le péricarde et l'épicarde au niveau de la zone infarctée. Ainsi le péricarde peut jouer le rôle d'incubateur naturel en apportant des facteurs et en promouvant une angiogenèse du greffon (Philippe Menasché et al. 2015).

c) Microparticules

Les microparticules sont des objets solides d'une taille relativement faible (de l'ordre du micromètre) qui peuvent être utilisés comme transporteurs de cellules. Elles peuvent être formulées pour encapsuler des cellules ou pour les transporter à leur surface. Des microparticules d'alginate ou de matrigel ont ainsi été formulées (Yu et al. 2010 ; Mayfield et al. 2014) et ont démontré des résultats positifs pour la réparation du myocarde lésé. Ces microparticules sont injectées dans le myocarde et présentent donc l'avantage d'être moins invasives que les greffes épiqueardiques.

d) Nanofibres

Les nanofibres sont des matrices de polymères présentant une structure en réseau faites de fibres ayant un diamètre de l'ordre du nanomètre (< 500 nm). Plusieurs biomatériaux constitués de nanofibres ont fait l'objet d'études pour leur capacité à participer à la régénération myocardique après infarctus. Par exemple, des nanofibres de poly-3-hydroxybutyrate, de poly-caprolactone ou d'acide poly-lactique ont été obtenus par électrospinning et ont été transplantées dans un modèle d'infarctus chez le rat (Castellano et al. 2014). Cette étude a démontré que les fibres de poly-3-hydroxybutyrate étaient les plus bénéfiques et avaient ainsi le meilleur potentiel régénératif et la meilleure propension à activer le remodelage bénéfique. Les nanofibres, de par leur structure fibreuse, sont aussi susceptibles de mieux retenir les cellules en les retenant grâce à l'enchevêtrement des fibres, ce qui pourrait améliorer leur rétention myocardique et leur survie. Ainsi, des cellules souches mésenchymateusesensemencées sur des nanofibres de poly-caprolactone et de gélatine ont été greffées dans un modèle d'infarctus chez le rat (Kai et al. 2014). Les résultats montrent que les cellules greffées ont migré dans la cicatrice fibreuse et ont induit la formation de nouveaux vaisseaux. La cicatrice fibreuse a ainsi été diminuée en taille et la fonction cardiaque est alors améliorée. Une autre équipe a étudié comment des nanofibres de poly-uréthaneensemencées avec des myoblastes pouvaient prévenir la dysfonction cardiaque après infarctus chez le rat (Giraud et al. 2010). Ces patches ont été greffés à la surface de l'épicarde au niveau de la cicatrice fibreuse et ont démontré un effet positif sur la progression de l'insuffisance cardiaque 9 mois après le traitement. De manière très intéressante ce patch est correctement intégré dans le tissu cardiaque et des vaisseaux néo-formés ont colonisé le biomatériau, faisant de cette approche une stratégie prometteuse pour l'ingénierie tissulaire cardiaque appliquée à la thérapie cellulaire.

4. Interactions hôte-biomatériaux

Après un déficit en apport vasculaire, la régénération cardiaque étant très faible, une cicatrice fibreuse s'installe de manière durable associée à une perte de fonction tissulaire. La réparation de cette cicatrice fibreuse passe par différentes phases incluant une phase hémostatique, inflammatoire, de prolifération cellulaire et de remodelage tissulaire (Aller et al. 2014 ; DiPietro 2013). De la même manière, les réponses tissulaires de l'hôte induites par l'implantation d'un biomatériau correspondent aux mêmes étapes. Cependant, les matrices biologiques, correctement modulées, ont la capacité de modifier le résultat du processus de cicatrisation et de permettre une reconstruction tissulaire plus rapide par une refunctionalisation du tissu lésé.

a) Les étapes de l'interaction hôte-biomatériau

Les différentes étapes induites par l'implantation d'un biomatériau (associée à un traumatisme chirurgical) jusqu'au remodelage tissulaire constructif sont résumées dans la *Figure 15*. Quelques temps après l'implantation du patch, l'hémostase a lieu au niveau du tissu receveur (dans notre cas il s'agit du myocarde). Le biomatériau va alors adsorber des protéines à sa surface ce qui va initier l'établissement de ponts matriciels entre le biomatériau et le myocarde. La réponse immunitaire innée débute avec le recrutement de neutrophiles qui est suivi par la réponse des macrophages qui vont dégrader les matrices et permettre aux cellules d'infiltrer les patchs. Après plusieurs semaines, des cellules souches sont recrutées et vont se différencier pour permettre la formation d'un nouveau tissu cardiaque à partir du dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire. Durant le processus de dégradation d'un patch fabriqué à partir de matrice naturelle (tissu décellularisé par exemple), un peptide matricryptique est libéré. Ce peptide est activé et relargué au cours de la dégradation du biomatériau et potentialise la polarisation des macrophages et le recrutement de cellules souches. En effet ce peptide possède des séquences proches de la matrice extracellulaire. Des études ont montré que ce peptide permet d'améliorer le potentiel de régénération par la migration et la prolifération de nombreux types cellulaires comme les cellules souches périvericulaires et les cellules endothéliales (Agrawal et al. 2011 ; Reing et al. 2009 ; Vorotnikova et al. 2010). Les biomatériaux d'origine naturelle possèdent donc un potentiel pour la régénération cardiaque plus important que des biomatériaux synthétiques.

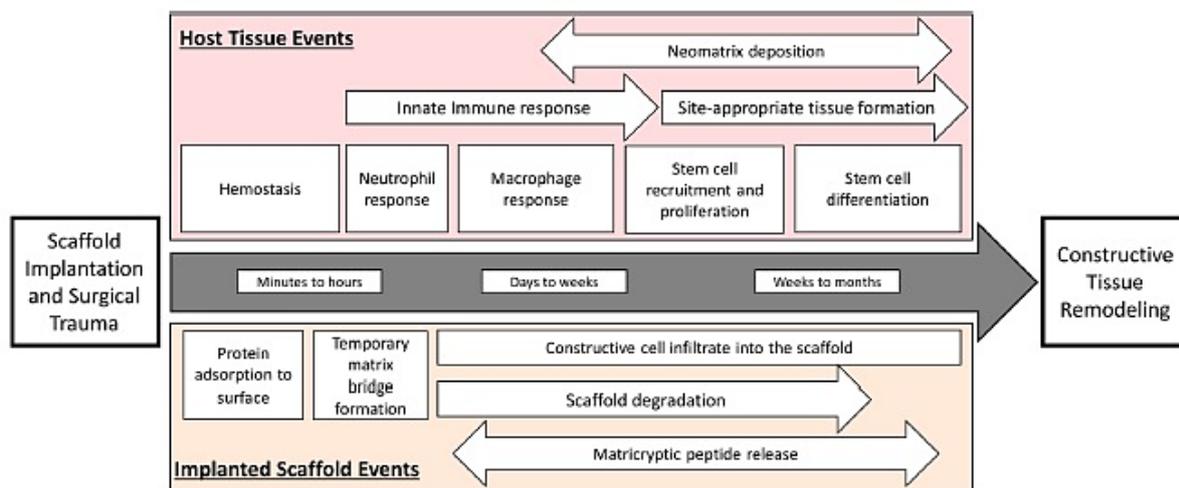


Figure 15 : Schématisation des différentes étapes du processus de réparation tissulaire induite par l'implantation d'un biomatériau (Londono et Badylak 2015).

b) Réponse immunitaire

Après les étapes de coagulation et d'hémostase, la réponse immunitaire apparaît quelques heures après la greffe. Elle intervient en réaction aux corps étrangers mais également aux microorganismes potentiellement présents dans le biomatériau. La reconstruction tissulaire est entièrement dépendante de la réponse inflammatoire (Hart

2002). En cas d'incompatibilité, les cellules immunitaires vont former une barrière entre le myocarde et le biomatériau. La réponse inflammatoire est modulée en fonction de la composition du biomatériau (surface, paramètres physico-chimiques, matériaux naturels ou synthétiques, présence de cellules ou de molécules chimio attractives), du traumatisme chirurgical induit par l'implantation mais également des produits libérés par la dégradation des patches.

Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées sur le lieu de l'inflammation (*Figure 16*). Ils ont un rôle bactéricide et libèrent des molécules de reconnaissance des cellules en apoptose afin qu'elles soient identifiées par les macrophages puis phagocytées (Witko-Sarsat et al. 2000). Les neutrophiles vont également produire différentes enzymes capables de dégrader les biomatériaux tels que les collagénases, élastases, et protéases sérine. Ces enzymes ont également un rôle important dans la reconstruction tissulaire facilitant l'angiogenèse et l'infiltration de cellules dans les matrices. Différentes cytokines, chemokines, leukotrienes et prostaglandines sont également produites par les neutrophiles.

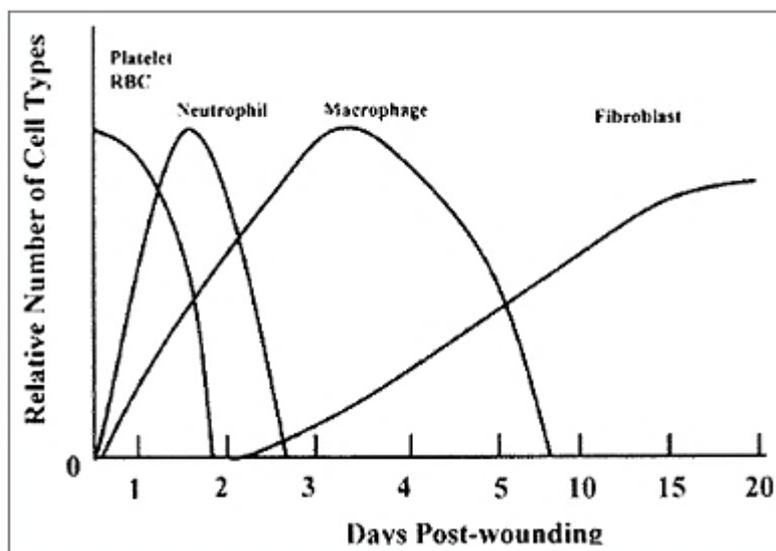


Figure 16 : Représentation graphique de l'arrivée des cellules dans la cicatrice après l'implantation d'un patch.

Les cytokines pro-inflammatoire comme $TNF\alpha$ et $IL1\beta$ vont permettre le recrutement des cellules les plus importantes de la réponse inflammatoire : les macrophages. Ils sont recrutés entre le 3ème et le 7ème jour. Plusieurs études montrent que la déplétion de macrophages inhibe la dégradation des biomatériaux implantés ainsi que la libération du peptide matricryptique associé à une très faible reconstruction tissulaire (Valentin et al. 2009). Les macrophages ont un rôle de régulateur cellulaire. Ils vont débarrasser la zone inflammatoire des cellules mortes et activer les kératinocytes, fibroblastes et cellules endothéliales (Diegelmann et Evans 2004).

Il existe deux grands types de macrophages : le type M1 et le type M2. Le phénotype des macrophages recrutées a une influence sur la reconstruction tissulaire.

Les macrophages de type M1 sont caractérisés par la production d'un haut niveau de cytokines pro-inflammatoires : IL12, IL23, iNOS, IL1 β , IL6 et TNF. Ils sont recrutés en présence d'un biomatériau qui a, par exemple, été ponté avec un agent chimique ou qui est contaminé par des endotoxines. La présence des macrophages M1 est donc l'indicateur d'une réponse inflammatoire importante liée à une faible biocompatibilité des biomatériaux. En revanche, les macrophages de type M2 induisent la libération de cytokines favorables à une bonne réparation tissulaire comme IL10, TGF β , activine A, arginase et ornithine. Les M2 sont présents quand les biomatériaux sont naturels, non pontés avec un agent chimique laissant des résidus toxiques avec un maintien de l'ultrastructure des biomatériaux (Londono et Badylak 2015).

Le troisième type cellulaire à intervenir dans la réparation tissulaire est les lymphocytes T. Les macrophages M2 favorisent l'activation des lymphocytes T-régulateurs ainsi que des cellules NK (« natural killers cells ») tandis que les macrophages M1 activent des lymphocytes T-CD4+ (*Figure 17*). La réponse immunitaire sera plus importante en présence de cellules T CD4+ qu'en présence de cellules T-régulatrices. De nombreuses études ont montré que les cellules T CD4+ contribuent à la diffusion de la cicatrice fibreuse après un infarctus du myocarde (Hofmann et Frantz 2015).

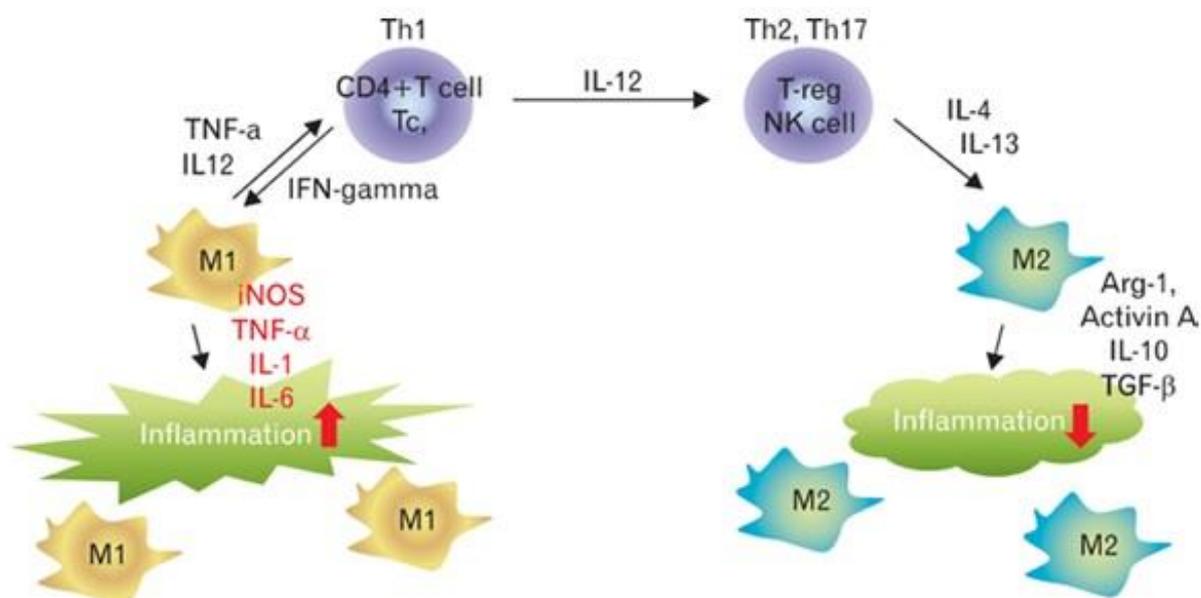


Figure 17 : Mécanisme d'action des macrophages en fonction de leur polarisation avec les lymphocytes T (schéma modifié à partir de l'article (Shin, Ahn, et Matsumoto 2012)).

Il apparaît donc comme essentiel que le biomatériau et les cellules implantées puissent avoir un rôle immuno-modulateur et favoriser la réponse M2. De la même manière, ce rôle immuno-modulateur peut avoir des effets non-négligeables concernant l'intégration du biomatériau au niveau du myocarde.

Partie 4 : Projet et objectifs de ma thèse

Il est possible de résumer mon travail de thèse par l'étude de l'effet de la greffe épiscopordique de trois types de biomatériaux pour la thérapie cardiaque :

- La première partie porte sur l'évaluation de l'implantation des feuilles de cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux puis des feuilles de cellules souches musculaires associées à des progéniteurs cardiaques de souris dans un modèle animal de cardiomyopathie dilatée (Hamdi et al. 2013).
- La seconde partie présente le projet principal de ma thèse concernant le développement d'un biomatériau en nanofibres de collagène supportant les cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines pour le traitement des cardiomyopathies dilatées (Kitsara et al. 2015 ; Joanne et al. 2016).
- La troisième et dernière partie de ce projet correspond à l'étude biologique d'un hydrogel naturel de chitosane non cellularisé pour la revascularisation de la zone infarctée pour les cardiopathies ischémiques chez le rat (Fiainigo et al. 2016).

Bibliographie de l'introduction

- Aggarwal, Sudeepta, et Mark F. Pittenger. 2005. « Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses ». *Blood* 105 (4): 1815-22. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.
- Agrawal, Vineet, Jeremy Kelly, Stephen Tottey, Kerry A. Daly, Scott A. Johnson, Bernard F. Siu, Janet Reing, et Stephen F. Badylak. 2011. « An Isolated Cryptic Peptide Influences Osteogenesis and Bone Remodeling in an Adult Mammalian Model of Digit Amputation ». *Tissue Engineering. Part A* 17 (23-24): 3033-44. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0257.
- Aller, Maria-Angeles, Jose-Ignacio Arias, Luis-Alfonso Arraez-Aybar, Carlos Gilsanz, et Jaime Arias. 2014. « Wound Healing Reaction: A Switch from Gestation to Senescence ». *World Journal of Experimental Medicine* 4 (2): 16-26. doi:10.5493/wjem.v4.i2.16.
- Araña, Miriam, Juan J. Gavira, Estefanía Peña, Arantxa González, Gloria Abizanda, Myriam Cilla, Marta M. Pérez, et al. 2014. « Epicardial Delivery of Collagen Patches with Adipose-Derived Stem Cells in Rat and Minipig Models of Chronic Myocardial Infarction ». *Biomaterials* 35 (1): 143-51. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.083.
- Assmus, Birgit, Volker Schächinger, Claudius Teupe, Martina Britten, Ralf Lehmann, Natascha Döbert, Frank Grünwald, et al. 2002. « Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI) ». *Circulation* 106 (24): 3009-17.
- Bartunek, Jozef, Atta Behfar, Dariouch Dolatabadi, Marc Vanderheyden, Miodrag Ostojic, Jo Dens, Badih El Nakadi, 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 ». *Journal of the American College of Cardiology* 61 (23): 2329-38. doi:10.1016/j.jacc.2013.02.071.
- Behfar, Atta, Leonid V. Zingman, Denice M. Hodgson, Jean-Michel Razzier, Garvan C. Kane, Andre Terzic, et Michel Pucéat. 2002. « Stem Cell Differentiation Requires a Paracrine Pathway in the Heart ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (12): 1558-66. doi:10.1096/fj.02-0072com.
- Bellamy, Valérie, Valérie Vanneaux, Alain Bel, Hany Nemetalla, Solène Emmanuelle Boitard, Yohan Farouz, Pierre Joanne, et al. 2015. « Long-Term Functional Benefits of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Embedded into a Fibrin Scaffold ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 34 (9): 1198-1207. doi:10.1016/j.healun.2014.10.008.
- Bergmann, Olaf, Ratan D. Bhardwaj, Samuel Bernard, Sofia Zdunek, Fanie Barnabé-Heider, Stuart Walsh, Joel Zupicich, et al. 2009. « Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans ». *Science (New York, N. Y.)* 324 (5923): 98-102. doi:10.1126/science.1164680.
- Birket, Matthew J., Marcelo C. Ribeiro, Arie O. Verkerk, Dorien Ward, Ana Rita Leitoguinho, Sabine C. den Hartogh, Valeria V. Orlova, et al. 2015. « Expansion and Patterning of Cardiovascular Progenitors Derived from Human Pluripotent Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 33 (9): 970-79. doi:10.1038/nbt.3271.
- Blin, Guillaume, David Nury, Sonia Stefanovic, Tui Neri, Oriane Guillevic, Benjamin Brinon, Valérie Bellamy, et al. 2010. « A Purified Population of Multipotent Cardiovascular Progenitors Derived from Primate Pluripotent Stem Cells Engrafts in Postmyocardial Infarcted Nonhuman Primates ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (4): 1125-39. doi:10.1172/JCI40120.
- Boudoulas, Konstantinos Dean, Filippou Triposciadis, Paraschos Geleris, et Harisios Boudoulas. 2016. « Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management ». *Progress in Cardiovascular Diseases* 58 (6): 676-92. doi:10.1016/j.pcad.2016.04.003.
- Burridge, Paul W., Elena Matsa, Praveen Shukla, Ziliang C. Lin, Jared M. Churko, Antje D. Ebert, Feng Lan, et al. 2014. « Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes ». *Nature Methods* 11 (8): 855-60. doi:10.1038/nmeth.2999.
- Cao, Nan, He Liang, Jijun Huang, Jia Wang, Yixiong Chen, Zhongyan Chen, et Huang-Tian Yang. 2013. « Highly Efficient Induction and Long-Term Maintenance of Multipotent Cardiovascular Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells under Defined Conditions ». *Cell Research* 23 (9): 1119-32. doi:10.1038/cr.2013.102.
- Caspi, Oren, Ayelet Lesman, Yaara Basevitch, Amira Gepstein, Gil Arbel, Irit Huber Manhal Habib, Lior Gepstein, et Shulamit Levenberg. 2007. « Tissue Engineering of Vascularized Cardiac Muscle from Human Embryonic Stem Cells ». *Circulation Research* 100 (2): 263-72. doi:10.1161/01.RES.0000257776.05673.ff.
- Castellano, Delia, María Blanes, Bruno Marco, Inmaculada Cerrada, Amparo Ruiz-Saurí, Beatriz Pelacho, Miriam Araña, et al. 2014. « A Comparison of Electrospun Polymers Reveals poly(3-Hydroxybutyrate) Fiber as a

- Superior Scaffold for Cardiac Repair ». *Stem Cells and Development* 23 (13): 1479-90. doi:10.1089/scd.2013.0578.
- Chin, B. B., Y. Nakamoto, J. W. M. Bulte, M. F. Pittenger, R. Wahl, et D. L. Kraitchman. 2003. « 111In Oxine Labelled Mesenchymal Stem Cell SPECT after Intravenous Administration in Myocardial Infarction ». *Nuclear Medicine Communications* 24 (11): 1149-54. doi:10.1097/01.mnm.0000101606.64255.03.
- Chiono, Valeria, Pamela Mozetic, Monica Boffito, Susanna Sartori, Emilia Gioffredi, Antonella Silvestri, Alberto Rainer, et al. 2014. « Polyurethane-Based Scaffolds for Myocardial Tissue Engineering ». *Interface Focus* 4 (1): 20130045. doi:10.1098/rsfs.2013.0045.
- Choi, Yeong-Hoon, Andreas Kurtz, et Christof Stamm. 2011. « Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Cell Therapy ». *Human Gene Therapy* 22 (1): 3-17. doi:10.1089/hum.2010.211.
- Chong, James J. H., Xiulan Yang, Creighton W. Don, Elina Minami, Yen-Wen Liu, Jill J. Weyers, William M. Mahoney, et al. 2014. « Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts ». *Nature* 510 (7504): 273-77. doi:10.1038/nature13233.
- Christman, Karen L., Hubert H. Fok, Richard E. Sievers, Qizhi Fang, et Randall J. Lee. 2004. « Fibrin Glue Alone and Skeletal Myoblasts in a Fibrin Scaffold Preserve Cardiac Function after Myocardial Infarction ». *Tissue Engineering* 10 (3-4): 403-9. doi:10.1089/107632704323061762.
- Chugh, Atul R., Garth M. Beache, John H. Loughran, Nathan Mewton, Julius B. Elmore, Jan Kajstura, Patroklos Pappas, et al. 2012. « Administration of Cardiac Stem Cells in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: The SCPIO Trial: Surgical Aspects and Interim Analysis of Myocardial Function and Viability by Magnetic Resonance ». *Circulation* 126 (11 Suppl 1): S54-64. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.092627.
- Chung, Eugene S., Leslie Miller, Amit N. Patel, Russell David Anderson, Farrell O. Mendelsohn, Jay Traverse, Kevin H. Silver, 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 ». *European Heart Journal* 36 (33): 2228-38. doi:10.1093/eurheartj/ehv254.
- Citro, Lucas, Shan Naidu, Fatemat Hassan, M. Lakshmi Kuppasamy, Periannan Kuppasamy, Mark G. Angelos, et Mahmood Khan. 2014. « Comparison of Human Induced Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes with Human Mesenchymal Stem Cells Following Acute Myocardial Infarction ». *PLoS One* 9 (12): e116281. doi:10.1371/journal.pone.0116281.
- Copeland, J. G., R. G. Smith, F. A. Arabia, P. E. Nolan, et M. E. Banchy. 2000. « The CardioWest Total Artificial Heart as a Bridge to Transplantation ». *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 12 (3): 238-42.
- Dai, Wangde, Sharon L. Hale, Gregory L. Kay, Aarne J. Jyrala, et Robert A. Kloner. 2009. « Delivering Stem Cells to the Heart in a Collagen Matrix Reduces Relocation of Cells to Other Organs as Assessed by Nanoparticle Technology ». *Regenerative Medicine* 4 (3): 387-95. doi:10.2217/rme.09.2.
- Davis, Michael E., Patrick C. H. Hsieh, Alan J. Grodzinsky, et Richard T. Lee. 2005. « Custom Design of the Cardiac Microenvironment with Biomaterials ». *Circulation Research* 97 (1): 8-15. doi:10.1161/01.RES.0000173376.39447.01.
- Davis, R C, F D R Hobbs, et G Y H Lip. 2000. « History and epidemiology ». *BMJ: British Medical Journal* 320 (7226): 39-42.
- Deb, Arjun, Shaohua Wang, Kimberly A. Skelding, Dylan Miller, David Simper, et Noel M. Caplice. 2003. « Bone Marrow-Derived Cardiomyocytes Are Present in Adult Human Heart: A Study of Gender-Mismatched Bone Marrow Transplantation Patients ». *Circulation* 107 (9): 1247-49.
- Diegelmann, Robert F., et Melissa C. Evans. 2004. « Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 9 (janvier): 283-89.
- DiPietro, Luisa A. 2013. « Angiogenesis and Scar Formation in Healing Wounds ». *Current Opinion in Rheumatology* 25 (1): 87-91. doi:10.1097/BOR.0b013e32835b13b6.
- Dong, Ruonan, Xin Zhao, Baolin Guo, et Peter X. Ma. 2016. « Self-Healing Conductive Injectable Hydrogels with Antibacterial Activity as Cell Delivery Carrier for Cardiac Cell Therapy ». *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (27): 17138-50. doi:10.1021/acsami.6b04911.
- Ebelt, Henning, Mirco Jungblut, Ying Zhang, Thomas Kubin, Sawa Kostin, Antje Technau, Svetlana Oustanina, et al. 2007. « Cellular Cardiomyoplasty: Improvement of Left Ventricular Function Correlates with the Release of Cardioactive Cytokines ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (1): 236-44. doi:10.1634/stemcells.2006-0374.
- Fiamingo, Anderson, Alexandra Montebault, Solène-Emmanuelle Boitard, Hany Naemetalla, Onnik Agbulut, Thierry Delair, Sérgio Paulo Campana-Filho, Philippe Menasché, et Laurent David. 2016. « Chitosan

- Hydrogels for the Regeneration of Infarcted Myocardium: Preparation, Physicochemical Characterization, and Biological Evaluation ». *Biomacromolecules* 17 (5): 1662-72. doi:10.1021/acs.biomac.6b00075.
- Gaertner, Roger, Damien Logeart, Jean-Baptiste Michel, et Jean-Jacques Mercadier. 2004. « [Early left ventricular remodelling following acute coronary accident] ». *Médecine Sciences: M/S* 20 (6-7): 643-50. doi:10.1051/medsci/2004206-7643.
- Gaetani, Roberto, Dries A. M. Feyen, Pieter A. Doevendans, Hendrik Gremmels, Elvira Forte, Joost O. Fledderus, Faiz Z. Ramjankhan, et al. 2014. « Different Types of Cultured Human Adult Cardiac Progenitor Cells Have a High Degree of Transcriptome Similarity ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18 (11): 2147-51. doi:10.1111/jcmm.12458.
- Giraud, Marie-Noëlle, Remy Flueckiger, Stéphane Cook, Erick Ayuni, Matthias Siepe, Thierry Carrel, et Hendrik Tevæarai. 2010. « Long-Term Evaluation of Myoblast Seeded Patches Implanted on Infarcted Rat Hearts ». *Artificial Organs* 34 (6): E184-192. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00979.x.
- Gnecchi, Massimiliano, Zhiping Zhang, Aiguo Ni, et Victor J. Dzau. 2008. « Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy ». *Circulation Research* 103 (11): 1204-19. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176826.
- Gomez-Mauricio, Remedios Guadalupe, Argia Acarregui, Francisco Miguel Sánchez-Margallo, Verónica Crisóstomo, Ignacio Gallo, Rosa María Hernández, José Luis Pedraz, Gorka Orive, et María Fernanda Martín-Cancho. 2013. « A Preliminary Approach to the Repair of Myocardial Infarction Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells Encapsulated in Magnetic Resonance-Labelled Alginate Microspheres in a Porcine Model ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 84 (1): 29-39. doi:10.1016/j.ejpb.2012.11.028.
- Guo, Hai-Dong, Hai-Jie Wang, Yu-Zhen Tan, et Jin-Hong Wu. 2011. « Transplantation of Marrow-Derived Cardiac Stem Cells Carried in Fibrin Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction ». *Tissue Engineering, Part A* 17 (1-2): 45-58. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0124.
- Hagège, Albert A., Jean-Pierre Marolleau, Jean-Thomas Vilquin, Armelle Alhérière, Séverine Peyrard, Denis Duboc, Eric Abergel, et al. 2006. « Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure: Long-Term Follow-up of the First Phase I Cohort of Patients ». *Circulation* 114 (1 Suppl): I108-113. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000521.
- Hamdi, Hadhami, Solène Emmanuelle Boitard, Valérie Planat-Benard, Julia Pouly, Hany Neamatalla, Pierre Joanne, Marie-Cécile Perier, et al. 2013. « Efficacy of Epicardially Delivered Adipose Stroma Cell Sheets in Dilated Cardiomyopathy ». *Cardiovascular Research* 99 (4): 640-47. doi:10.1093/cvr/cvt149.
- Hamdi, Hadhami, Akira Furuta, Valérie Bellamy, Alain Bel, Etienne Puymirat, Séverine Peyrard, Onnik Agbulut, et Philippe Menasché. 2009. « Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison ». *The Annals of Thoracic Surgery* 87 (4): 1196-1203. doi:10.1016/j.athoracsur.2008.12.074.
- Haq, S., G. Choukroun, H. Lim, K. M. Tymitz, F. del Monte, J. Gwathmey, L. Grazette, et al. 2001. « Differential Activation of Signal Transduction Pathways in Human Hearts with Hypertrophy versus Advanced Heart Failure ». *Circulation* 103 (5): 670-77.
- Hart, J. 2002. « Inflammation. 1: Its Role in the Healing of Acute Wounds ». *Journal of Wound Care* 11 (6): 205-9. doi:10.12968/jowc.2002.11.6.26411.
- Hershberger, Ray E., et Ana Morales. 1993. « Dilated Cardiomyopathy Overview ». In *GeneReviews*(®), édité par Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Stephanie E. Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D. Bird, et al. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1309/>.
- Hofmann, Ulrich, et Stefan Frantz. 2015. « Role of Lymphocytes in Myocardial Injury, Healing, and Remodeling after Myocardial Infarction ». *Circulation Research* 116 (2): 354-67. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304072.
- Islas, Jose Francisco, Yu Liu, Kuo-Chan Weng, Matthew J. Robertson, Shuxing Zhang, Allan Prejusa, John Harger, et al. 2012. « Transcription Factors ETS2 and MESP1 Transdifferentiate Human Dermal Fibroblasts into Cardiac Progenitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (32): 13016-21. doi:10.1073/pnas.1120299109.
- Itzhaki, Ilanit, Jackie Schiller, Rafael Beyar, Jonathan Satin, et Lior Gepstein. 2006. « Calcium Handling in Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes: Of Mice and Men ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1080 (octobre): 207-15. doi:10.1196/annals.1380.017.
- Jefferies, John Lynn, Timothy M. Hoffman, et David P. Nelson. 2010. « Heart Failure Treatment in the Intensive Care Unit in Children ». *Heart Failure Clinics* 6 (4): 531-558, ix-x. doi:10.1016/j.hfc.2010.06.001.

- Jessup, Mariell, Barry Greenberg, Donna Mancini, Thomas Cappola, Daniel F. Pauly, Brian Jaski, Alex Yaroshinsky, et al. 2011. « Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Patients with Advanced Heart Failure ». *Circulation* 124 (3): 304-13. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.022889.
- Joanne, Pierre, Maria Kitsara, Solène-Emmanuelle Boitard, Hany Naemetalla, Valérie Vanneaux, Mathieu Pernot, Jérôme Larghero, et al. 2016. « Nanofibrous Clinical-Grade Collagen Scaffolds Seeded with Human Cardiomyocytes Induces Cardiac Remodeling in Dilated Cardiomyopathy ». *Biomaterials* 80 (février): 157-68. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.035.
- Kadner, Karen, Stephan Dobner, Thomas Franz, Deon Bezuidenhout, Mazin S. Sirry, Peter Zilla, et Neil H. Davies. 2012. « The Beneficial Effects of Deferred Delivery on the Efficiency of Hydrogel Therapy Post Myocardial Infarction ». *Biomaterials* 33 (7): 2060-66. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.031.
- Kai, Dan, Qiang-Li Wang, Hai-Jie Wang, Molamma P. Prabhakaran, Yanzhong Zhang, Yu-Zhen Tan, et Seeram Ramakrishna. 2014. « Stem Cell-Loaded Nanofibrous Patch Promotes the Regeneration of Infarcted Myocardium with Functional Improvement in Rat Model ». *Acta Biomaterialia* 10 (6): 2727-38. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.030.
- Kajstura, Jan, Narasimman Gurusamy, Barbara Ogórek, Polina Goichberg, Carlos Clavo-Rondon, Toru Hosoda, Domenico D'Amario, et al. 2010. « Myocyte Turnover in the Aging Human Heart ». *Circulation Research* 107 (11): 1374-86. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.231498.
- Karantalis, Vasileios, et Joshua M. Hare. 2015. « Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease ». *Circulation Research* 116 (8): 1413-30. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614.
- Kattman, Steven J., Alec D. Witty, Mark Gagliardi, Nicole C. Dubois, Maryam Niapour, Akitsu Hotta, James Ellis, et Gordon Keller. 2011. « Stage-Specific Optimization of Activin/nodal and BMP Signaling Promotes Cardiac Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Lines ». *Cell Stem Cell* 8 (2): 228-40. doi:10.1016/j.stem.2010.12.008.
- Katz, Arnold M. 2008. « The "Modern" View of Heart Failure How Did We Get Here? ». *Circulation: Heart Failure* 1 (1): 63-71. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.772756.
- Keating, Armand. 2012. « Mesenchymal Stromal Cells: New Directions ». *Cell Stem Cell* 10 (6): 709-16. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015.
- Keller, G. M. 1995. « In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Current Opinion in Cell Biology* 7 (6): 862-69.
- Kitsara, Maria, Pierre Joanne, Solène Emmanuelle Boitard, Ibtihel Ben Dhiab, Barbara Poinard, Philippe Menasché, Christian Gagnieu, Patricia Forest, Onnik Agbulut, et Yong Chen. 2015. « Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers ». *Microelectronic Engineering, Micro/Nano Biotechnologies & Systems* 2014, 144 (août): 46-50. doi:10.1016/j.mee.2015.02.034.
- Knollmann, Björn C., et Dan M. Roden. 2008. « A Genetic Framework for Improving Arrhythmia Therapy ». *Nature* 451 (7181): 929-36. doi:10.1038/nature06799.
- Kobirumaki-Shimozawa, Fuyu, Kotaro Oyama, Takahiro Serizawa, Akari Mizuno, Tatsuya Kagemoto, Togo Shimozawa, Shin'ichi Ishiwata, Satoshi Kurihara, et Norio Fukuda. 2012. « Sarcomere Imaging by Quantum Dots for the Study of Cardiac Muscle Physiology ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012: 313814. doi:10.1155/2012/313814.
- Kofidis, Theo, Jorg L. de Bruin, Grant Hoyt, Yen Ho, Masashi Tanaka, Toshiyuki Yamane, Darren R. Lebl, et al. 2005. « Myocardial Restoration with Embryonic Stem Cell Bioartificial Tissue Transplantation ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 24 (6): 737-44. doi:10.1016/j.healun.2004.03.023.
- Koh, G. Y., M. H. Soonpaa, M. G. Klug, H. P. Pride, B. J. Cooper, D. P. Zipes, et L. J. Field. 1995. « Stable Fetal Cardiomyocyte Grafts in the Hearts of Dystrophic Mice and Dogs ». *The Journal of Clinical Investigation* 96 (4): 2034-42. doi:10.1172/JCI118251.
- Kutschka, Ingo, Ian Y. Chen, Theo Kofidis, Takayasu Arai, Georges von Degenfeld, Ahmad Y. Sheikh, Stephen L. Hendry, et al. 2006. « Collagen Matrices Enhance Survival of Transplanted Cardiomyoblasts and Contribute to Functional Improvement of Ischemic Rat Hearts ». *Circulation* 114 (1 Suppl): I167-173. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001297.
- Lakshmanan, Rajesh, Uma Maheswari Krishnan, et Swaminathan Sethuraman. 2013. « Polymeric Scaffold Aided Stem Cell Therapeutics for Cardiac Muscle Repair and Regeneration ». *Macromolecular Bioscience* 13 (9): 1119-34. doi:10.1002/mabi.201300223.
- Latrémouille, Christian, Daniel Duveau, Bernard Cholley, Luca Zilberstein, Guillaume Belbis, Marie-Fazia Boughenou, Denis Meleard, et al. 2015. « Animal Studies with the Carmat Bioprosthetic Total Artificial

- Heart ». *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 47 (5): e172-178-179. doi:10.1093/ejcts/ezv010.
- Lesman, Ayelet, Manhal Habib, Oren Caspi, Amira Gepstein, Gil Arbel, Shulamit Levenberg, et Lior Gepstein. 2010. « Transplantation of a Tissue-Engineered Human Vascularized Cardiac Muscle ». *Tissue Engineering, Part A* 16 (1): 115-25. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0130.
- Lewandowski, Jarosław, et Maciej Kurpisz. 2016. « Techniques of Human Embryonic Stem Cell and Induced Pluripotent Stem Cell Derivation ». *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, mars. doi:10.1007/s00005-016-0385-y.
- Li, Xiaofei, Kenichi Tamama, Xiaoyun Xie, et Jianjun Guan. 2016. « Improving Cell Engraftment in Cardiac Stem Cell Therapy ». *Stem Cells International* 2016: 7168797. doi:10.1155/2016/7168797.
- Lian, Xiaojun, Xiaoping Bao, Misha Zilberter, Mattias Westman, André Fisahn, Cheston Hsiao, Laurie B. Hazeltine, Kaitlin K. Dunn, Timothy J. Kamp, et Sean P. Palecek. 2015. « Chemically defined albumin-free human cardiomyocyte generation ». *Nature methods* 12 (7): 595-96. doi:10.1038/nmeth.3448.
- Lian, Xiaojun, Cheston Hsiao, Gisela Wilson, Kexian Zhu, Laurie B. Hazeltine, Samira M. Azarin, Kunil K. Raval, Jianhua Zhang, Timothy J. Kamp, et Sean P. Palecek. 2012. « Robust Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells via Temporal Modulation of Canonical Wnt Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27): E1848-1857. doi:10.1073/pnas.1200250109.
- Liu, Mei-Lan, Toshio Nagai, Masakuni Tokunaga, Koji Iwanaga, Katsuhisa Matsuura, Toshinao Takahashi, Masato Kanda, et al. 2014. « Anti-Inflammatory Peptides from Cardiac Progenitors Ameliorate Dysfunction after Myocardial Infarction ». *Journal of the American Heart Association* 3 (6): e001101. doi:10.1161/JAHA.114.001101.
- Londono, Ricardo, et Stephen F. Badylak. 2015. « Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of in Vivo Remodeling ». *Annals of Biomedical Engineering* 43 (3): 577-92. doi:10.1007/s10439-014-1103-8.
- Malliaras, Konstantinos, Raj R. Makkar, Rachel R. Smith, Ke Cheng, Edwin Wu, Robert O. Bonow, Linda Marbán, 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) ». *Journal of the American College of Cardiology* 63 (2): 110-22. doi:10.1016/j.jacc.2013.08.724.
- Mallon, Barbara S., Rebecca S. Hamilton, Olga A. Kozhich, Kory R. Johnson, Yang C. Fann, Mahendra S. Rao, et Pamela G. Robey. 2014. « Comparison of the molecular profiles of human embryonic and induced pluripotent stem cells of isogenic origin ». *Stem Cell Research* 12 (2): 376-86. doi:10.1016/j.scr.2013.11.010.
- Maureira, Pablo, Pierre-Yves Marie, Fengxu Yu, Sylvain Poussier, Yihua Liu, Frederique Groubatch, Aude Falanga, et Nguyen Tran. 2012. « Repairing Chronic Myocardial Infarction with Autologous Mesenchymal Stem Cells Engineered Tissue in Rat Promotes Angiogenesis and Limits Ventricular Remodeling ». *Journal of Biomedical Science* 19: 93. doi:10.1186/1423-0127-19-93.
- Mayfield, Audrey E., Everad L. Tilokee, Nicholas Latham, Brian McNeill, Bu-Khanh Lam, Marc Ruel, Erik J. Suuronen, David W. Courtman, Duncan J. Stewart, et Darryl R. Davis. 2014. « The Effect of Encapsulation of Cardiac Stem Cells within Matrix-Enriched Hydrogel Capsules on Cell Survival, Post-Ischemic Cell Retention and Cardiac Function ». *Biomaterials* 35 (1): 133-42. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.085.
- Menasché, P., A. A. Hagège, M. Scorsin, B. Pouzet, M. Desnos, D. Duboc, K. Schwartz, J. T. Vilquin, et J. P. Marolleau. 2001. « Myoblast Transplantation for Heart Failure ». *Lancet (London, England)* 357 (9252): 279-80. doi:10.1016/S0140-6736(00)03617-5.
- Menasché, P., et V. Vanneaux. 2016. « Stem Cells for the Treatment of Heart Failure ». *Current Research in Translational Medicine* 64 (2): 97-106. doi:10.1016/j.retram.2016.04.003.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Isabelle Cacciapuoti, Alexandre Parouchev, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors for Severe Heart Failure Treatment: First Clinical Case Report ». *European Heart Journal* 36 (30): 2011-17. doi:10.1093/eurheartj/ehv189.
- Messina, Elisa, Luciana De Angelis, Giacomo Frati, Stefania Morrone, Stefano Chimenti, Fabio Fiordaliso, Monica Salio, et al. 2004. « Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart ». *Circulation Research* 95 (9): 911-21. doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51.
- Morrow, Thomas. 2015. « New Drug Entresto for Heart Failure Drums Up a Lot of Enthusiasm ». *Managed Care (Langhorne, Pa.)* 24 (8): 38-39.
- Mummery, Christine L., Jianhua Zhang, Elizabeth S. Ng, David A. Elliott, Andrew G. Elefanty, et Timothy J. Kamp. 2012. « Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to

- Cardiomyocytes A Methods Overview ». *Circulation Research* 111 (3): 344-58. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- Nam, Young-Jae, Christina Lubczyk, Minoti Bhakta, Tong Zang, Antonio Fernandez-Perez, John McAnally, Rhonda Bassel-Duby, Eric N. Olson, et Nikhil V. Munshi. 2014. « Induction of Diverse Cardiac Cell Types by Reprogramming Fibroblasts with Cardiac Transcription Factors ». *Development (Cambridge, England)* 141 (22): 4267-78. doi:10.1242/dev.114025.
- Nussbaum, Jeannette, Elina Minami, Michael A. Laflamme, Jitka A. I. Virag, Carol B. Ware, Amanda Masino, Veronica Muskheli, Lil Pabon, Hans Reinecke, et Charles E. Murry. 2007. « Transplantation of Undifferentiated Murine Embryonic Stem Cells in the Heart: Teratoma Formation and Immune Response ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (7): 1345-57. doi:10.1096/fj.06-6769com.
- Pillekamp, Frank, Moritz Hausteil, Markus Khalil, Markus Emmelheinz, Rewa Nazzal, Roland Adelman, Filomain Nguemo, et al. 2012. « Contractile Properties of Early Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Beta-Adrenergic Stimulation Induces Positive Chronotropy and Lusitropy but Not Inotropy ». *Stem Cells and Development* 21 (12): 2111-21. doi:10.1089/scd.2011.0312.
- Pittenger, Mark F., et Bradley J. Martin. 2004. « Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics ». *Circulation Research* 95 (1): 9-20. doi:10.1161/01.RES.0000135902.99383.6f.
- Porrello, Enzo R., Ahmed I. Mahmoud, Emma Simpson, Joseph A. Hill, James A. Richardson, Eric N. Olson, et Hesham A. Sadek. 2011. « Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6020): 1078-80. doi:10.1126/science.1200708.
- Reing, Janet E., Li Zhang, Julie Myers-Irvin, Kevin E. Cordero, Donald O. Freytes, Ellen Heber-Katz, Khamilia Bedelbaeva, et al. 2009. « Degradation Products of Extracellular Matrix Affect Cell Migration and Proliferation ». *Tissue Engineering. Part A* 15 (3): 605-14. doi:10.1089/ten.tea.2007.0425.
- Reis, Lewis A., Loraine L. Y. Chiu, Yan Liang, Kent Hyunh, Abdul Momen, et Milica Radisic. 2012. « A Peptide-Modified Chitosan-Collagen Hydrogel for Cardiac Cell Culture and Delivery ». *Acta Biomaterialia* 8 (3): 1022-36. doi:10.1016/j.actbio.2011.11.030.
- Rossini, Alessandra, Caterina Frati, Costanza Lagrasta, Gallia Graiani, Alessandro Scopece, Stefano Cavalli, Ezio Musso, et al. 2011. « Human Cardiac and Bone Marrow Stromal Cells Exhibit Distinctive Properties Related to Their Origin ». *Cardiovascular Research* 89 (3): 650-60. doi:10.1093/cvr/cvq290.
- Rubinov, Emil, Jonathan Leor, et Smadar Cohen. 2011. « The Promotion of Myocardial Repair by the Sequential Delivery of IGF-1 and HGF from an Injectable Alginate Biomaterial in a Model of Acute Myocardial Infarction ». *Biomaterials* 32 (2): 565-78. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.097.
- Schönberger, J., et C. E. Seidman. 2001. « Many Roads Lead to a Broken Heart: The Genetics of Dilated Cardiomyopathy ». *American Journal of Human Genetics* 69 (2): 249-60. doi:10.1086/321978.
- Shin, Taekyun, Meejung Ahn, et Yoh Matsumoto. 2012. « Mechanism of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Lewis Rats: Recent Insights from Macrophages ». *Anatomy & Cell Biology* 45 (3): 141-48. doi:10.5115/acb.2012.45.3.141.
- Spearman, Benjamin S., Alexander J. Hodge, John L. Porter, John G. Hardy, Zenda D. Davis, Teng Xu, Xinyu Zhang, Christine E. Schmidt, Michael C. Hamilton, et Elizabeth A. Lipke. 2015. « Conductive Interpenetrating Networks of Polypyrrole and Polycaprolactone Encourage Electrophysiological Development of Cardiac Cells ». *Acta Biomaterialia* 28 (décembre): 109-20. doi:10.1016/j.actbio.2015.09.025.
- Stachelek, Stanley J., Ivan Alferiev, James Fulmer, Harry Ischiropoulos, et Robert J. Levy. 2007. « Biological Stability of Polyurethane Modified with Covalent Attachment of Di-Tert-Butyl-Phenol ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 82 (4): 1004-11. doi:10.1002/jbm.a.31215.
- Sun, Cheuk-Kwan, Yen-Yi Zhen, Steve Leu, Tzu-Hsien Tsai, Li-Teh Chang, Jiunn-Jye Sheu, Yung-Lung Chen, et al. 2014. « Direct Implantation versus Platelet-Rich Fibrin-Embedded Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Treating Rat Acute Myocardial Infarction ». *International Journal of Cardiology* 173 (3): 410-23. doi:10.1016/j.ijcard.2014.03.015.
- Sürder, Daniel, Robert Manka, Viviana Lo Cicero, Tiziano Moccetti, Kaspar Rufibach, Sabrina Soncin, Lucia Turchetto, et al. 2013. « Intracoronary Injection of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Early or Late after Acute Myocardial Infarction: Effects on Global Left Ventricular Function ». *Circulation* 127 (19): 1968-79. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001035.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5): 861-72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.

- Tokunaga, Masakuni, Mei-Lan Liu, Toshio Nagai, Koji Iwanaga, Katsuhisa Matsuura, Toshinao Takahashi, Masato Kanda, et al. 2010. « Implantation of Cardiac Progenitor Cells Using Self-Assembling Peptide Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (6): 972-83. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.09.015.
- Urbanek, Konrad, Daniela Cesselli, Marcello Rota, Angelo Nascimbene, Antonella De Angelis, Toru Hosoda, Claudia Bearzi, et al. 2006. « Stem Cell Niches in the Adult Mouse Heart ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (24): 9226-31. doi:10.1073/pnas.0600635103.
- Valentin, Jolene E., Ann M. Stewart-Akers, Thomas W. Gilbert, et Stephen F. Badylak. 2009. « Macrophage Participation in the Degradation and Remodeling of Extracellular Matrix Scaffolds ». *Tissue Engineering, Part A* 15 (7): 1687-94. doi:10.1089/ten.tea.2008.0419.
- van Berlo, Jop H., Onur Kanisicak, Marjorie Maillet, Ronald J. Vagnozzi, Jason Karch, Suh-Chin J. Lin, Ryan C. Middleton, Eduardo Marbán, et Jeffery D. Molkentin. 2014. « C-Kit+ Cells Minimally Contribute Cardiomyocytes to the Heart ». *Nature* 509 (7500): 337-41. doi:10.1038/nature13309.
- van den Akker, Frederieke, Dries A. M. Feyen, Patricia van den Hoogen, Linda W. van Laake, Esther C. M. van Eeuwijk, Imo Hofer, Gerard Pasterkamp, et al. 2016. « Intramyocardial Stem Cell Injection: Go(ne) with the Flow ». *European Heart Journal*, février. doi:10.1093/eurheartj/ehw056.
- van der Spoel, Tycho I. G., Krijn R. Vrijsen, Stefan Koudstaal, Joost P. G. Sluijter, Johannes Frank W. Nijsen, Hugo W. de Jong, Imo E. Hofer, et al. 2012. « Transendocardial Cell Injection Is Not Superior to Intracoronary Infusion in a Porcine Model of Ischaemic Cardiomyopathy: A Study on Delivery Efficiency ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16 (11): 2768-76. doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01594.x.
- Vorotnikova, Ekaterina, Donna McIntosh, Abiche Dewilde, Jianping Zhang, Janet E. Reing, Li Zhang, Kevin Cordero, et al. 2010. « Extracellular Matrix-Derived Products Modulate Endothelial and Progenitor Cell Migration and Proliferation in Vitro and Stimulate Regenerative Healing in Vivo ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 29 (8): 690-700. doi:10.1016/j.matbio.2010.08.007.
- Wada, Rie, Naoto Muraoka, Kohei Inagawa, Hiroyuki Yamakawa, Kazutaka Miyamoto, Taketaro Sadahiro, Tomohiko Umei, et al. 2013. « Induction of Human Cardiomyocyte-like Cells from Fibroblasts by Defined Factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (31): 12667-72. doi:10.1073/pnas.1304053110.
- Wainwright, John M., Caitlin A. Czajka, Urvi B. Patel, Donald O. Freytes, Kimimasa Tobita, Thomas W. Gilbert, et Stephen F. Badylak. 2010. « Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart ». *Tissue Engineering, Part C, Methods* 16 (3): 525-32. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0392.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, et L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. « Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (5): 617-53.
- Yang, Y., P. Dreessen de Gervai, J. Sun, M. Glogowski, E. Gussakovsky, et V. Kupriyanov. 2012. « MRI Studies of Cryoinjury Infarction in Pig Hearts: II. Effects of Intrapericardial Delivery of Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) Embedded in Agarose Gel ». *NMR in Biomedicine* 25 (2): 227-35. doi:10.1002/nbm.1735.
- Yu, Jiashing, Kim T. Du, Qizhi Fang, Yiping Gu, Shirley S. Mihardja, Richard E. Sievers, Joseph C. Wu, et Randall J. Lee. 2010. « The Use of Human Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in RGD Modified Alginate Microspheres in the Repair of Myocardial Infarction in the Rat ». *Biomaterials* 31 (27): 7012-20. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.078.
- Zhang, Jianhua, Gisela F. Wilson, Andrew G. Soerens, Chad H. Koonce, Junying Yu, Sean P. Palecek, James A. Thomson, et Timothy J. Kamp. 2009. « Functional Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Circulation Research* 104 (4): e30-41. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.192237.

**Chapitre 1 : Evaluation de l'implantation de feuilles de
cellules souches mésenchymateuses du tissu
adipeux et myoblastes associées aux progéniteurs
cardiaques murins dans un modèle animal de
cardiomyopathie dilatée**

Introduction et présentation du projet

La cardiomyopathie dilatée non-ischémique est caractérisée par la perte du nombre de cardiomyocytes pouvant être d'origine génétique (Mestroni et al. 2014), environnementale (Hershberger et Siegfried 2011), ou idiopathique (Hazebroek, Dennert, et Heymans 2012) causant la chute de la contractilité du myocarde et à terme une insuffisance cardiaque.

La thérapie cellulaire pour la régénération cardiaque a été beaucoup étudiée dans les cas d'infarctus du myocarde et les cardiopathies ischémiques chroniques (Ou et al. 2010 ; Harding, Roberts, et Mirochnitchenko 2013), montrant un potentiel bénéfique. Cependant très peu d'études ont été effectuées dans le contexte des cardiomyopathies dilatées. La cardiomyopathie dilatée est définie par la mort des cardiomyocytes sur l'ensemble du cœur ce qui en fait une pathologie diffuse à la différence de l'infarctus du myocarde où la mortalité des cardiomyocytes est localisée dans la région ischémique. Une stratégie consistant en un traitement de l'ensemble du ventricule représente donc un intérêt.

Pour cela, nous avons choisi au laboratoire, d'utiliser une stratégie basée sur la greffe épiscopale. Cette approche a l'avantage de vectoriser les cellules d'intérêt à l'ensemble du ventricule traité sans causer à celui-ci des dommages supplémentaires comme dans le cas de multiples injections intraventriculaires par exemple. Plusieurs approches basées sur la greffe épiscopale ont été explorées par de nombreuses équipes (Hamdi et al. 2009 ; Gerbin et al. 2015). Ainsi, la première partie de mon projet de thèse consistait à étudier les effets de la greffe épiscopale d'une feuille de cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque appliquée aux cardiomyopathies dilatées.

1. Intérêt des feuilles de cellules

Les feuilles de cellules sont constituées uniquement de cellules jointives et de la matrice extracellulaire que ces cellules synthétisent. L'obtention de ces biomatériaux repose sur l'utilisation d'une surface de culture cellulaire thermosensible (Shimizu et al. 2002). Ainsi, à température physiologique (37°C) les cellules adhèrent et se développent normalement sur cette surface. En revanche lorsque celle-ci est placée à température ambiante (20-25°C), les propriétés de la surface changent et, de ce fait, les cellules se détachent du support. Si celles-ci sont jointives elles se détachent sous la forme d'une feuille de cellules qu'il est alors possible de récupérer. Il a été montré que les feuilles de cellules sont utilisables en médecine régénératrice et permettent la reconstruction du tissu myocardique (Shimizu et al. 2003). En comparaison avec les injections intra-myocardiques, la greffe épiscopale de feuille de cellules est moins traumatisante pour le cœur et permet une meilleure survie des cellules greffées ainsi qu'une amélioration de la fonction cardiaque (Hamdi et al. 2009). De plus, des cellules greffées de manière épiscopale ont été retrouvées dans le myocarde ce qui indique qu'une migration des cellules greffées est possible (Hamdi et al. 2011). Les feuilles de cellules sont également intéressantes car elles ne nécessitent pas le développement

d'un biomatériau comme support de greffe épicaudique, les cellules de la feuille se chargeant elles-mêmes de la synthèse de matrice extra-cellulaire. La feuille de cellules est donc un pseudo-tissu qui se forme naturellement en culture cellulaire et qui peut être directement greffé sur l'épicaud du receveur.

2. Les progéniteurs cardiovasculaires dérivés des cellules souches embryonnaires

Des nombreuses études de thérapies cellulaires cardiaques ont cherché à déterminer les meilleurs types cellulaires qui pouvaient être utilisés pour une telle application. Il se dégage de toutes ces études que les cellules les plus efficaces semblent être des cellules induites vers le lignage cardiaque (Crisostomo et al. 2008; Li et al. 2012). Ainsi les cellules souches mésenchymateuses exposées à des facteurs cardiopoïétiques (Bartunek et al. 2013), ou des cardiosphères (Malliaras et al. 2014) ont démontré des résultats supérieurs à d'autres types cellulaires. Les cellules souches pluripotentes sont également très attractives car elles peuvent être différenciées vers n'importe quel lignage cellulaire incluant le lignage cardiaque (Pal 2009). Ainsi, en 2005, l'équipe du Pr. Ménasché a pu démontrer que des progéniteurs cardiovasculaires (cellules SSEA-1 négatives, ou CD15-) dérivés à partir de cellules souches embryonnaires murines induisaient une amélioration fonctionnelle dans un modèle d'infarctus chez le mouton 1 mois après leur injection (Ménard et al. 2005). Des progéniteurs similaires, dérivés à partir de cellules souches embryonnaires humaines, font actuellement l'objet d'un essai clinique (ESCORT, (Menasché et al. 2015)). Ces cellules n'avaient cependant jamais été testées dans un modèle de cardiopathie dilatée.

Obtenir des feuilles de cellules SSEA-1 négatives (ou CD15-) est techniquement impossible car ces cellules requièrent des cellules nourricières pour proliférer. Etant dans un stade de maturation cardiaque très précoce elles ne possèdent pas non plus les protéines d'adhésions nécessaires qui leur permettraient de former une feuille de cellules cohésives. Ainsi il est nécessaire de leur adjoindre une feuille de cellules nourricières qui auront également un rôle de support.

3. Présentation des projets

Dans cette étude nous nous sommes donc intéressés à deux types cellulaires pour la formation de feuilles de cellules : les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC) et les myoblastes. L'objectif était d'utiliser ces feuilles comme support pour des progéniteurs cardiovasculaires dérivés de cellules souches embryonnaires afin de déterminer l'effet de ces cellules dans un modèle de cardiopathie dilatée.

a) Feuilles de cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC)

J'ai donc été impliquée dans une première étude au cours de mon stage de Master 2 au sein de l'équipe du Pr. Agbulut. Les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC) sont obtenues à partir du tissu adipeux et sont à l'origine des cellules

mésenchymateuses. Elles sont capables de produire de nombreuses cytokines bénéfiques dans le cadre de médecine régénératrice (Gimble, Katz, et Bunnell 2007).

Nous avons repris la même stratégie qu'une étude publiée par nos collaborateurs en 2010 (Bel et al. 2010). Dans cette étude, les auteurs ont démontré l'intérêt d'une greffe de feuilles de cellules composites (composées d'ADSC de primates et de progéniteurs cardiovasculaires de primates) dans un modèle d'infarctus chez le singe Rhésus (*Macaca mulata*). Ils ont ainsi démontré que l'approche était sûre (aucun développement de tératome) et que les cellules greffées pouvaient être retrouvées 2 mois après implantation. Cependant il n'a pas été possible de mettre en évidence une amélioration fonctionnelle car le modèle et les effectifs utilisés n'étaient pas favorables à une telle évaluation.

Ainsi nous avons choisi une stratégie similaire appliquée à un modèle différent : le modèle murin de cardiopathie dilatée. Cet article nous a permis de démontrer l'intérêt des feuilles de cellules dans un modèle de cardiomyopathie dilatée. Ces travaux ont été publiés dans la revue Cardiovascular Research (Hamdi et al. 2013).

Nous avons également, au cours de cette étude, observé que les feuilles d'ADSC murines ne pouvait pas être utilisées comme support pour des progéniteurs cardiovasculaires murins au contraire de ce qui avait été observé pour les cellules de primates. La co-culture des ADCS et des progéniteurs a été tentée plusieurs fois sans succès : les milieux nécessaires pour cultiver les ADSC et les cellules souches étant très différents, les progéniteurs ne survivaient pas à la culture sur les ADSC.

b) Feuilles de myoblastes

Une autre population de cellules a alors été choisie comme support trophique pour les progéniteurs cardiovasculaires : les myoblastes. En effet, les myoblastes sont les précurseurs des fibres musculaires du muscle strié squelettique qui possèdent une structure relativement proche des cardiomyocytes. Ces cellules ont été utilisées dans des essais cliniques de thérapie cellulaire cardiaque. Les myoblastes ont ainsi été utilisés via la technique de l'injection intra-ventriculaire et ont induit, certainement à cause de cette technique utilisée, des arythmies ventriculaires chez les patients traités (Menasché et al. 2008). Cependant, une stratégie basée sur la greffe épicaudique ne devrait pas conduire à des symptômes similaires. De plus, les myoblastes seront ici utilisés comme support pour la greffe de progéniteurs cardiovasculaires dérivés des cellules souches embryonnaires, ces dernières représentant le « principe actif » du traitement comme pour l'étude basée sur les ADSC.

Matériel et méthode

Les détails concernant l'obtention du modèle animal ainsi que les procédures d'analyses sont résumés dans le chapitre 2 – partie Méthodologie détaillée.

1. Obtention des feuilles de cellules

Les feuilles de cellules ont été formées par croissance des cellules d'intérêt sur des films thermosensibles, une technologie développée par l'équipe d'Okano (Shimizu et al. 2003). Les cellules sont cultivées pendant 48 heures (jusqu'à confluence) sur des films thermosensibles constitués d'un polymère de N-isopropylacrylamide (PIPAAm, UpCell™). Durant ce laps de temps, des connexions entre cellules vont se former et les cellules vont sécréter leur propre matrice extracellulaire (ou MEC). L'association des cellules jointives avec la matrice extracellulaire constitue une feuille. A 37°C, le support est hydrophobe et la feuille adhère donc à celui-ci (*Figure 18*). Quand la température est abaissée à 20°C, le support devient hydrophile et la feuille de cellules se détache du support sans avoir recours à des enzymes protéolytiques. Les feuilles sont alors prêtes à être implantées. Cependant leur manipulation est délicate car les feuilles sont très fragiles. Le transfert sur un support rigide pour déplacer la feuille est alors nécessaire. Dans cette étude, un support de Polydiméthylsiloxane ou PDMS a été utilisé (constituant du silicone – connu pour ses propriétés non-adhésives). En effet, la surface du PDMS étant hydrophobe elle évite à la feuille d'adhérer sur ce support et permet ainsi de le transférer de la boîte de culture au cœur de l'animal à greffer.

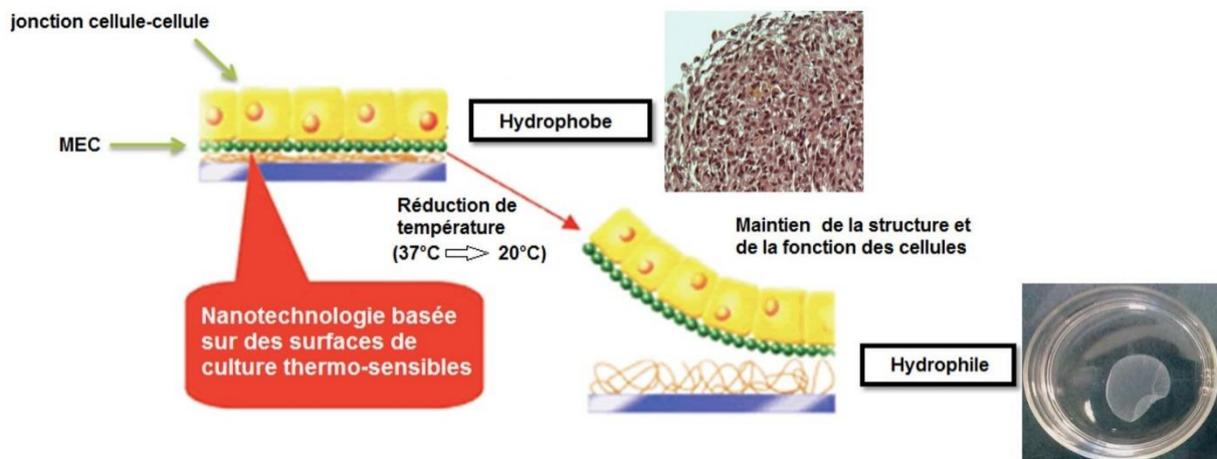


Figure 18 : Principe de l'obtention des feuilles de cellules sur support thermosensible

a) Préparation des feuilles d'ADSC

Les cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux ont été isolées à partir d'une biopsie du tissu adipeux inguinal prélevée sur des souris GFP positives ou normales (C57Bl6) (Planat-Benard et al. 2004). La présence de la GFP dans les cellules ADSC-GFP va permettre de localiser les cellules après la greffe et de suivre leur possible migration. L'isolement des explants tissulaires a été obtenu par digestion à 37° dans un milieu contenant du PBS, 2% de BSA (sérum albumine bovine)

et 2 mg/mL de collagénase (Sigma) pendant 45 minutes. Après élimination des fragments non digérés par filtration (filtre de 25 μm), les adipocytes matures ont été séparés de la fraction stromale vasculaire (contenant les cellules ADSC) par centrifugation (600g, 10 minutes). Les cellules ont ensuite été ensemencées sur la boîte thermosensible à la densité de 30 000 cellules/cm² dans un milieu DMEM/F12 avec 10 % de SVF (sérum de veau fœtal). Six heures après l'ensemencement, toutes les cellules non adhérentes ont été éliminées par lavage. Les cellules ADSC ont ensuite été cultivées pendant 3 jours dans le même milieu avant utilisation.

b) Préparation des feuilles de myoblastes

Les nouveau-nés de souris C57BL6 (J+1 post-natal) sont sacrifiés et les 4 membres sont récupérés. Après dissection de la peau, les muscles sont isolés et digérés à la collagénase pendant 1 heure à 37°C puis à la trypsine pendant 15 minutes. Pour 2g de tissu, une solution de 10mL de collagénase est nécessaire. Les cellules sont centrifugées puis récupérées dans un milieu complet (1/3 milieu 199 + 2/3 MEM +1% de pénicilline/streptomycine + 15% SVF + 5 ng/mL bFGF). Les cellules sont mises en culture à la densité de 200 000 cellules/cm² par boîte thermosensible.

c) Obtention des progéniteurs cardiovasculaires murins

Les progéniteurs cardiaques de souris proviennent de la lignée de cellules souches embryonnaires CGR8. Ces cellules ont été transduites avec le gène rapporteur β -Gal (Ménard et al. 2005). Elles sont cultivées dans un milieu de propagation (GMEM + 1% acides aminés non essentiels, 1% Na pyruvate, 0,7% de β -mercaptoéthanol, 1% de pénicilline/streptomycine, 7% SVF, et LIF 1/500^{ème}). Avant confluence, les cellules sont trypsinées et ensemencées en milieu de propagation pendant 3 heures. Puis, la BMP2 est ajoutée au milieu de différenciation à la concentration de 2,5 ng/mL (Invitrogen) pour initier une différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires. Les cellules sont ainsi cultivées pendant 36h puis les cellules CD15 négatives sont triées sur colonne magnétique (Miltenyi) par déplétion de cellules CD15 positives, puis ensemencées à la densité de 65 000 cellules/cm² sur les cellules nourricières (ADSC ou myoblastes) dans du milieu de différenciation (GMEM + 1% acides aminés non essentiels, 1% Na pyruvate, 0,7% de β -mercaptoéthanol, 1% de pénicilline/streptomycine, 20% SVF).

d) Obtention des feuilles composites

1) Après 12h de culture sur les cellules ADSC, aucun progéniteur cardiovasculaire n'a été retrouvé. Après analyse, la co-culture de ces deux populations cellulaires est létale pour ces progéniteurs. Les feuilles d'ADSC ont donc été greffées sans cellules progénitrices cardiovasculaires.

2) La composition des milieux de culture des progéniteurs cardiovasculaires et des myoblastes a été analysée et un milieu mixte a été obtenu. Les myoblastes sont

cultivés pendant 48h puis les progéniteurs sont ensemencés. Après 24h, les feuilles composites sont prêtes à être greffées.

2. Planification des expérimentations et constitution des groupes

Les détails concernant l'obtention du modèle animal ainsi que les procédures d'analyses sont résumés dans le chapitre 2 – partie Méthodologie détaillée. Le détail des groupes expérimentaux de cette étude est indiqué dans le *Tableau 2*.

Les manipulations se sont déroulées selon le protocole suivant : à J0, la cardiomyopathie dilatée est induite chez des souris âgées de trois mois par injection intra péritonéale de 20µg par g et par jour (en fonction du poids de l'animal) de tamoxifène (pendant 3 jours). Vingt et un jours après le déclenchement de la maladie, la fonction cardiaque est analysée par une première série d'échocardiographies pour l'ensemble des souris. Le dépôt de la feuille est alors réalisé sur les souris α MHCMerCreSfSf. La feuille est suturée directement sur le myocarde (fil 6/0). La fonction cardiaque est à nouveau mesurée par échocardiographie à J42, soit 21 jours après la greffe. Après chaque échographie, les souris sont pesées. Après la deuxième échographie, les souris sont sacrifiées pour réaliser les analyses histologiques et moléculaires. Pour éviter tout risque de rejet du greffon, les souris sont traitées chaque jour par injection intra péritonéale de cyclosporine, un immunosuppresseur, à la dose de 10 mg par kg.

	Groupe	Feuille implantée	Phénotype	Effectif
Etude Feuilles d'ADSC	Contrôle (saine)	Aucune	Souris SfSf	9
	Sham	Aucune	Souris α MHCMerCreSfSf	10
	Traité	Feuille ADSC ou Feuille ADSC-GFP	Souris α MHCMerCreSfSf	10 (ADSC) 10 (ADSC-GFP)
Etude Feuilles de myoblastes	Sham	Aucune	Souris α MHCMerCreSfSf	7
	Traité	Feuille myoblastes	Souris α MHCMerCreSfSf	10
	Traité	Feuille myoblastes (avec CD15-)	Souris α MHCMerCreSfSf	13

Tableau 2 : Composition des groupes de l'étude.

3. Coloration X-Gal

Ce protocole permet de détecter les cellules CD15 négatives (progéniteurs cardiaques de souris) qui possèdent le plasmide contenant le gène Lac Z codant pour l'enzyme β -Galactosidase. Pour repérer identifier ces cellules sur les coupes de tissus congelés, celles-ci sont incubées dans une solution contenant le substrat incolore X-Gal (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). La β -Galactosidase va hydrolyser le X-Gal et libérer ainsi un composé qui devient bleu et précipite suite à son oxydation (*Figure 19*). La présence des ions ferricyanures de potassium $Ke(Fe(CN)^6)$ est nécessaire dans la solution d'incubation, ayant un rôle d'oxydant-réducteur. Après la fixation des tissus dans un bain froid de méthanol (70%)-acétone (30%), une

incubation pendant 16h à 37°C dans la solution X-Gal est nécessaire. Cette solution comporte 4% de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 4% de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,20% de MgCl_2 , 2,50% de X-Gal, 90% de PBS et 0,1% de NP40. Une incubation avec un colorant Eosine B, suivie d'une fixation à l'acide acétique 0,1% est réalisée. Les lames sont montées avec un milieu de montage à base de glycérol gélatiné.

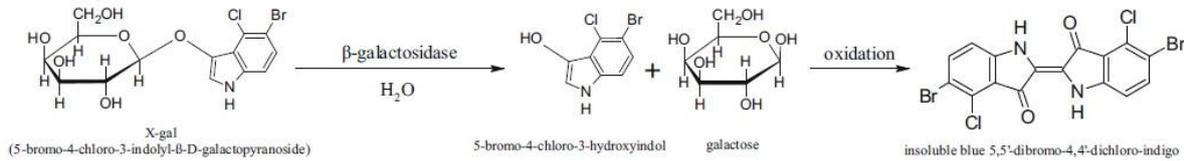


Figure 19 : Principe de la coloration X-Gal : réaction d'obtention d'un composé bleu dans les cellules précurseurs cardiaques CD15-.

4. Analyses immunohistochimiques

Différents immunomarquages ont été réalisés au cours de cette étude. L'ensemble des anticorps utilisés est résumé dans le *Tableau 3*. Les protocoles détaillés d'immunomarquages sont indiqués dans la partie *Méthodologie détaillée du chapitre 2*.

Anticorps	Référence	Dilution	Cible
Anti-Vinculine	Mouse - monoclonal, clone hVIN-1 (Sigma)	1 : 250	Sarcolemme et disque intercalaire
Anti-GFP	Rabbit - polyclonal, A11122 (Invitrogen)	1 : 800	Cellules ADSC-GFP
Anti-Ki67	Rat - monoclonal, clone TEC-3 (Dako)	1 : 100	Cellules en mitose
Anti-CD31	Rat - monoclonal, clone TLD-3A12 (AbD Serotec)	1 : 250	Cellules endothéliales
Anti-myosine squelettique fast (MHCf)	Souris – Monoclonal, clone MY-32 (Sigma)	1 : 400	Myoblastes

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour les immunomarquages.

5. Expression génique

Une étude de l'expression relative de différents gènes liés à l'insuffisance cardiaque et au développement de la fibrose cardiaque a également été réalisée au cours de cette étude par PCR quantitative en temps réel. L'ensemble des séquences des amorces utilisées est résumé dans le *Tableau 4*.

Gène	Sens	Anti-sens
MHC 1b (β-MHC)	5'AGGTGTGCTCTCCAGAATGG3'	5'CAGCGGCTTGATCTTGAAGT3'
ANF	5'ATCTGCCCTCTTGAAAAGCA3'	5'GCTCCAATCCTGTCAATCCT3'
BMP4	5'TGAGCCTTTCCAGCAAGTTT3'	5'CTCCCGGTCTCAGGTATCA3'
CTGF	5'ACTCTGCCAGTGGAGTTCAA3'	5'TTACGCCATGTCTCCGTACA3'
BNP	5'CAGCTCTTGAAGGACCAAGG3'	5'AGACCCAGGCAGAGTCAGAA3'
HIF1a	5'ACAACTGCCACCACTGATGA3'	5'GCCTTAGCAGTGGTCGTTTC3'
HPRT	5'AGGACCTCTCGAAGTGT3'	5'ATCAAATCCCTGAAGTACTCAT3'

Tableau 4 : Récapitulatif des séquences des gènes cibles étudiés par PCR quantitative en temps réel

Résultats

1. Etude des feuilles de cellules mésenchymateuses issues du tissu adipeux (ADSC)

Une première série de greffes a été réalisée avec des feuilles constituées de cellules souches mésenchymateuses obtenues à partir du tissu adipeux de souris surexprimant la protéine GFP (ADSC-GFP). La présence de cellules GFP permet de suivre au cours du temps le devenir de la feuille ainsi que la migration possible des cellules greffées. Après l'obtention des feuilles, une vérification de l'expression du gène rapporteur GFP est effectuée par immunomarquage anti-GFP. La majorité des cellules ADSC qui constituent la feuille de cellules sont GFP positives (*Figure 20A*). La feuille est formée d'une monocouche de cellules jointives reliées entre elles par de la matrice extracellulaire produite par les cellules elles-mêmes. La population de cellules ADSC-GFP n'est pas homogène comme le démontre les différences de niveau d'expression de la GFP sur les immunomarquages. La feuille est ensuite implantée sur l'épicarde au niveau du ventricule gauche des souris atteintes de cardiomyopathie dilatée. De par sa composition, elle adhère naturellement au cœur mais est néanmoins maintenue par deux points de suture pour résister aux contractions rapides du cœur de souris.

Trois semaines après la greffe, les feuilles sont retrouvées sur la majorité des cœurs greffés (*B*). L'identification de la feuille est possible de par sa structure très différente du tissu cardiaque. L'adhérence des feuilles sur le myocarde est totale (*C*) et une vascularisation est détectable par immunomarquage CD31 (*D*). Les cellules ADSC-GFP sont observables sur la feuille mais également dans le ventricule à proximité des vaisseaux (*E et F*). La migration des cellules greffées de la feuille vers le tissu cardiaque a donc été possible.

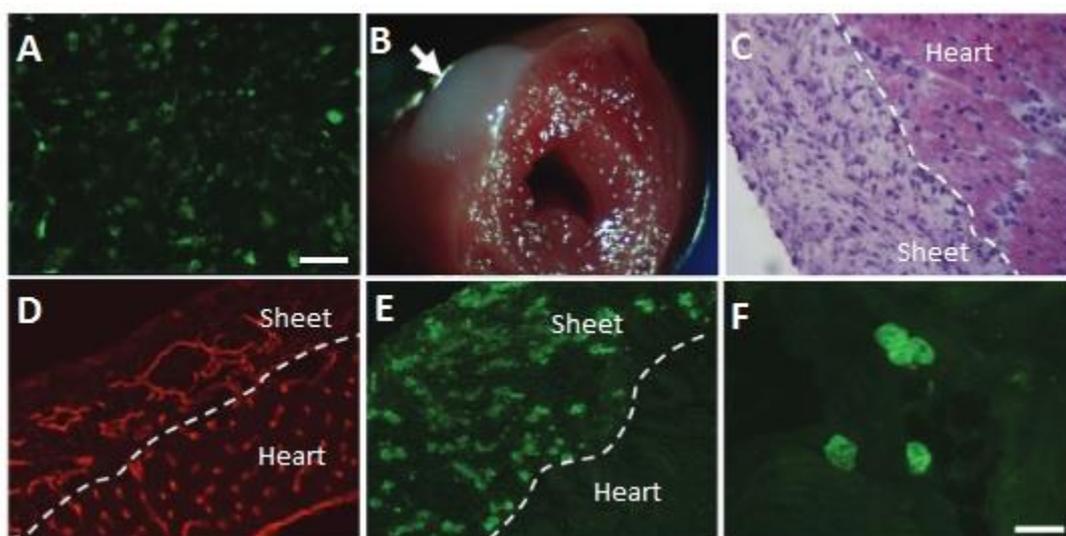


Figure 20 : Caractérisation des feuilles ADSC *in vitro* (A) et *in vivo* (B à F) par observation macroscopique (B), coloration histologique hématoxyline éosine (C), et après un immunomarquage CD31 pour l'analyse de la vascularisation de la feuille greffée (D) et détection des cellules ADSC implantées par immunomarquage GFP (A, E et F). Barre d'échelle : 100µm (A), 1,3mm (B), 50µm (C à E), 40µm (F).

L'effet de l'implantation des feuilles d'ADSC sur la fonction cardiaque des souris en insuffisance cardiaque a été mesurée par échocardiographie transthoracique. Les données des diamètres du ventricule gauche en fin de diastole et en fin de systole ainsi que la fraction de raccourcissement au moment de la greffe (baseline) et trois semaines après la greffe des feuilles ADSC (Sacrifice) sont indiquées sur la *Figure 21*. En l'absence de traitement, la fonction cardiaque des animaux SRF-MHC-CreMer se dégrade rapidement et le cœur se dilate : les diamètres ventriculaires augmentent significativement ($p=0,04$ en diastole et $p=0,004$ en systole). La fraction de raccourcissement se réduit également de manière significative ($p=0,0005$). Six semaines après l'injection du tamoxifène, l'insuffisance cardiaque est installée ; le cœur est en souffrance. En revanche, cette dégradation significative de la fonction cardiaque n'est pas observée dans le groupe des animaux traités avec la feuille de cellules ADSC. En effet, le diamètre en fin de systole et la fraction de raccourcissement sont significativement différents dans le groupe traité et dans le groupe non-traité (Sham). Les feuilles d'ADSC ont donc permis de stabiliser la fonction cardiaque au cours du temps. Le modèle de cardiomyopathie dilatée étant un modèle d'insuffisance très rapide avec une mortalité de 3 mois après l'injection de tamoxifène, la stabilisation de la fonction est le reflet d'un effet non négligeable des feuilles.

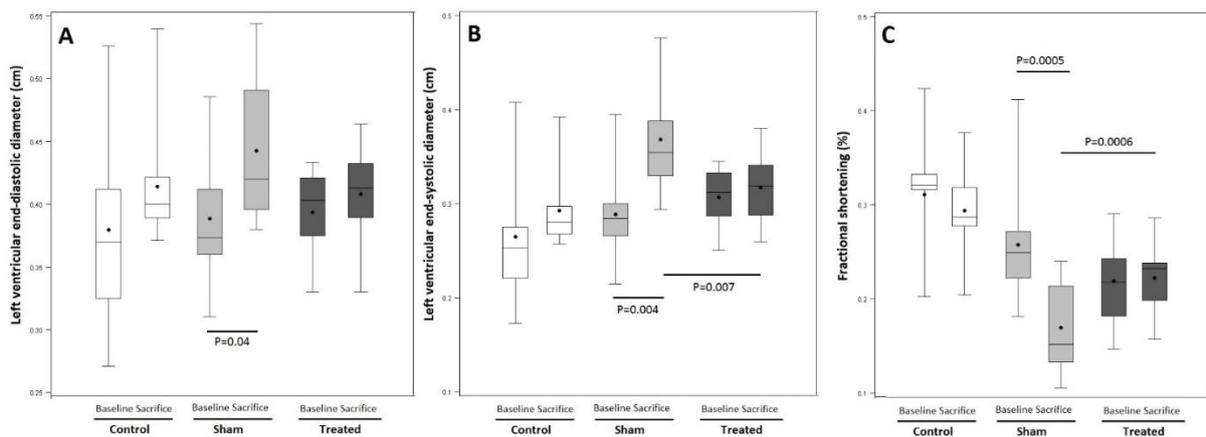


Figure 21 : Analyse de la fonction cardiaque par échocardiographie avant et après l'implantation des feuilles de cellules ADSC. Sur les Boxplots (ou boîte à moustache) sont représentés en blanc les animaux sains, en gris les animaux malades, et en noir les animaux malades traités par la feuille d'ADSC. A) Diamètre du ventricule gauche en fin de diastole, B) Diamètre du ventricule gauche en fin de systole, et C) Fraction de raccourcissement.

L'amélioration des paramètres cardiaques observée en échocardiographie est corrélée avec la réduction de l'expression de différents gènes liés à l'insuffisance cardiaque (*Figure 22*) comme la chaîne lourde β de la myosine β -MHC (A) ainsi que le facteur natriurétique atrial ANF (B) et la protéine morphogénique osseuse BMP4 (C). Pour comprendre par quel mécanisme les feuilles d'ADSC induisaient cet effet, nous avons mesuré la fibrose cardiaque. Nous pouvons ainsi observer la réduction du tissu fibreux par réduction de l'expression du facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF et réduction significative du pourcentage global de fibrose dans le tissu cardiaque (*Figure 22, D et E*).

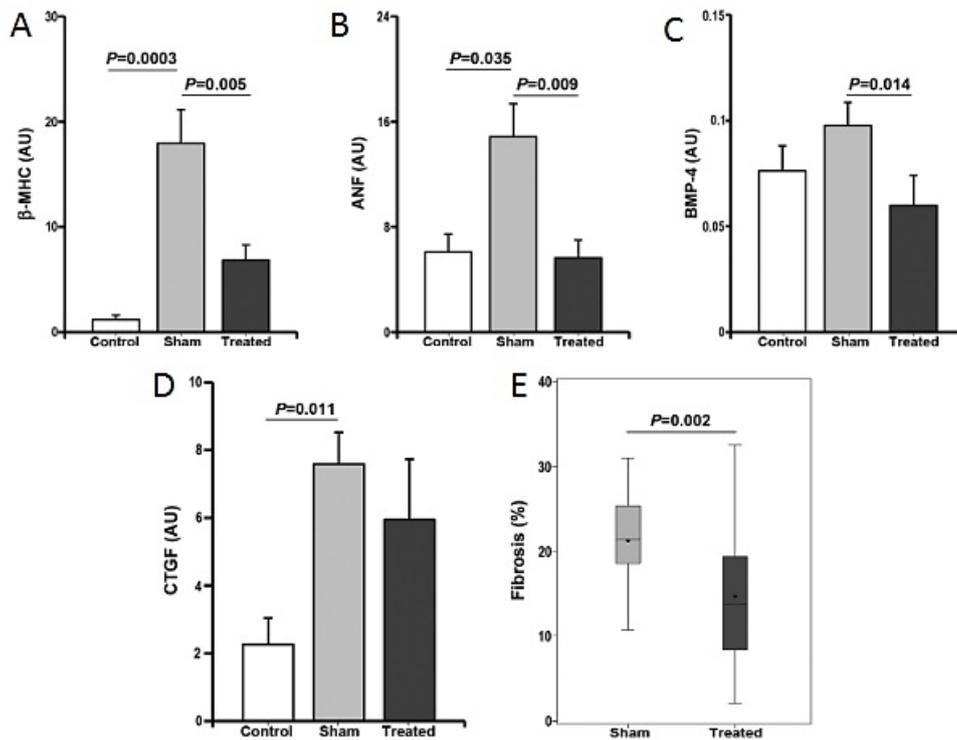


Figure 22 : Quantification relative de l'expression de différents gènes cardiaques : la chaîne lourde de la myosine bêta β -MHC, le facteur natriurétique atrial ANF et la protéine morphogénique osseuse BMP4 ; et analyse du tissu fibreux par quantification de l'expression génique du facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF et quantification de la fibrose après coloration Rouge Sirius.

Un second mécanisme d'action des feuilles d'ADSC est la réduction significative de la prolifération des cellules fibroblastiques (Figure 23) comme observé par la diminution du nombre de cellules Ki67 positives. Ceci est corrélé avec la réduction du pourcentage de fibrose observée précédemment. Une légère augmentation du pourcentage de cellules endothéliales est également observable. La présence des feuilles d'ADSC a donc modifié la prolifération des cellules présentes dans le myocarde.

Les cellules ADSC étant des cellules capables de produire beaucoup de cytokines, l'amélioration fonctionnelle induite par l'implantation des feuilles de cellules mésenchymateuses issu du tissu adipeux pourrait être liée à un effet paracrine c'est-à-dire aux effets molécules/substances produites par les cellules implantées à la périphérie cardiaque. Nous avons ainsi effectué une mesure de l'expression de cytokine par les feuilles d'ADSC en utilisant un test immunologique (antibody array). Les résultats obtenus démontrent que les feuilles d'ADSC expriment des cytokines telles que VEGF (vascular endothelial growth factor), SDF-1a (stromal cell-derived factor 1 alpha), SCF (Stem cell factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), HGF (hepatocyte growth factor) et P-selectin. Il faut noter que parmi ces cytokines, l'IGF-1 et l'HGF sont fortement exprimées par la feuille juste avant implantation (848 ± 202 and 160 ± 34 pg/mg, respectivement, mesuré par ELISA).

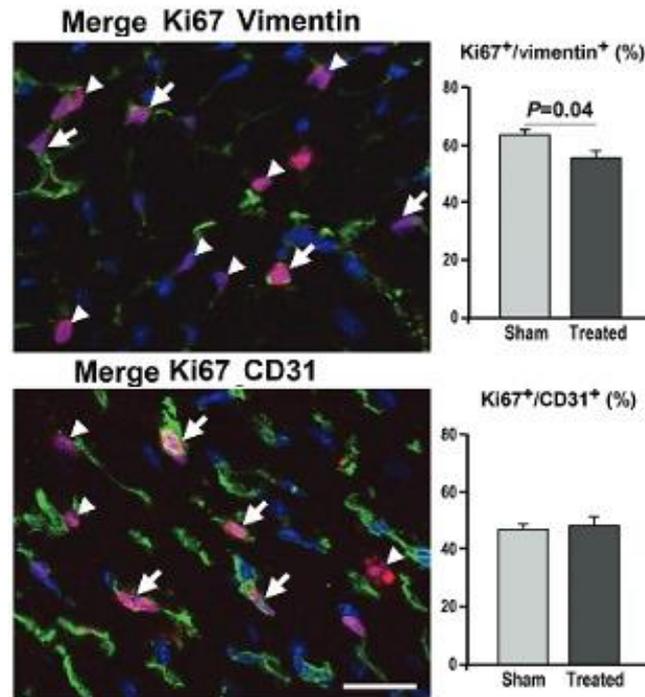


Figure 23 : Etude du phénotype des cellules en prolifération (Ki67 positive – en rouge) dans le myocarde greffé avec les feuilles de cellules ADSC par immunomarquage Vimentine (marqueur des filaments intermédiaires exprimés notamment dans les fibroblastes) et CD31 (marqueur des cellules endothéliales) en vert. Une quantification manuelle du nombre de cellules Ki67/Vimentine positive et Ki67/CD31 positive a été effectuée. Barre d'échelle : 25µm.

2. Etude des feuilles de myoblastes associées aux progéniteurs cardiaques de souris

L'objectif principal de l'utilisation des cellules ADSC était de fournir un support trophique nourricier aux progéniteurs cardiaques de souris. La co-culture entre les deux populations de cellules n'étant pas possible, cet objectif n'a donc pas été pleinement rempli.

Les milieux de culture des progéniteurs cardiaques de souris étant très proches de celui utilisé pour les cellules souches musculaires de souris, le choix d'utiliser les myoblastes pour constituer les feuilles de cellules a été fait pour la deuxième série de greffes. Après culture d'une feuille de myoblastes, les progéniteurs sontensemencés par-dessus. La majorité d'entre eux forme des amas cellulaires (ou cluster) comme montré sur la *Figure 24*.

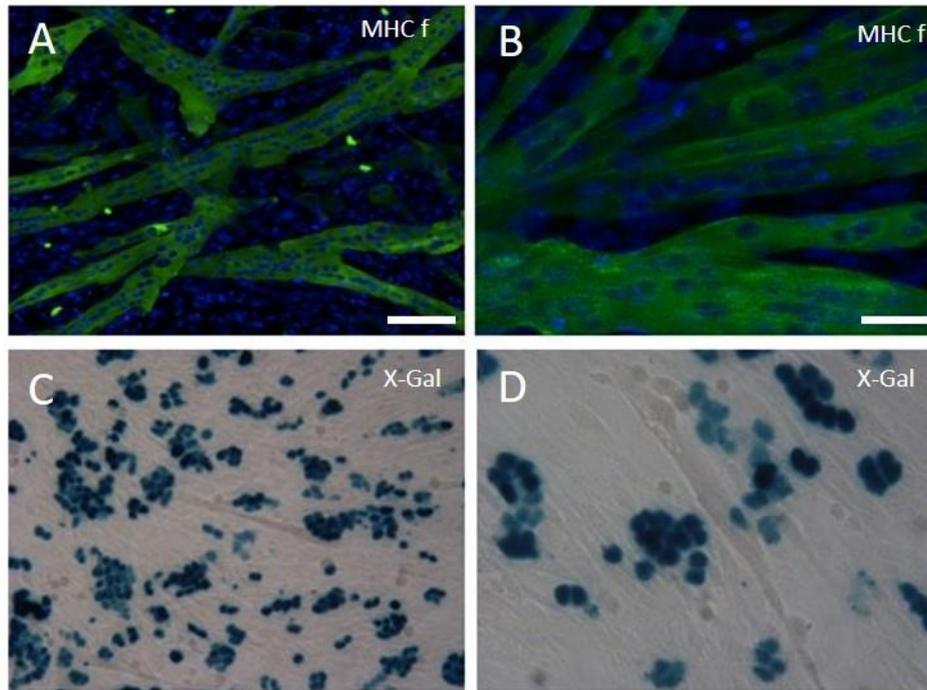


Figure 24 : Caractérisation des feuilles de myoblastes après culture à confluence (A et B) et après association avec les progéniteurs cardiaques murines CD15 négatives C et D) par immunomarquage de la myosine squelettique (MHCf) en vert et coloration X-Gal pour détecter les cellules CD15-. En effet, les cellules CD15- ont été transfectées avec le gène Lac Z exprimant la bêta-galactosidase. Après incubation avec le substrat X-Gal, les cellules apparaissent en bleu. Barre d'échelle : 50µm A et C, 25µm B et D.

Après l'obtention des feuilles mixtes, elles ont été implantées chez les souris SRF-MHC-CreMer dans les mêmes conditions que précédemment. Après trois semaines d'implantation, les feuilles de cellules sont présentes sur la majorité des cœurs greffés mais aucune cellule CD15- n'est détectable (Figure 25).

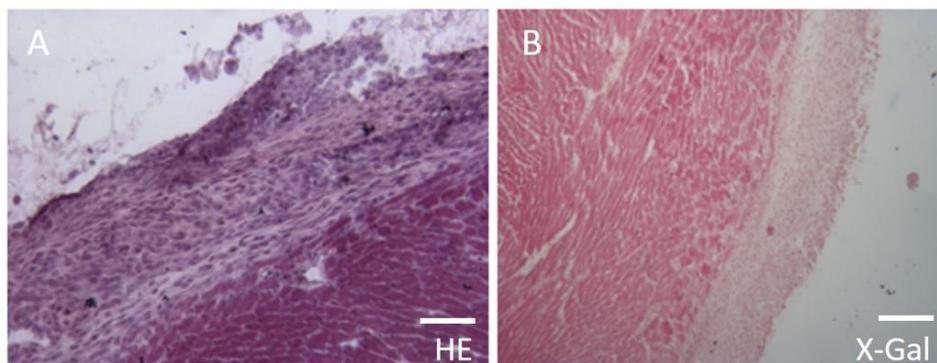


Figure 25 : Etude histologique des feuilles de myoblastes associées aux progéniteurs cardiaques par coloration hématoxyline-éosine (A) et coloration X-Gal. Après 3 semaines d'implantation les cellules CD15- n'ont pas été retrouvées.

L'analyse de la fonction cardiaque 3 semaines après l'implantation des feuilles de myoblastes seules ou myoblastes associés aux cellules CD15- a été effectuée (Figure 26). Les mesures du diamètre du cœur en fin de systole ainsi que de la fraction de raccourcissement n'ont pas donné de résultats significatifs entre les trois groupes.

Aucun effet des feuilles de myoblastes ou des feuilles mixtes ne peuvent être déduit de ces mesures.

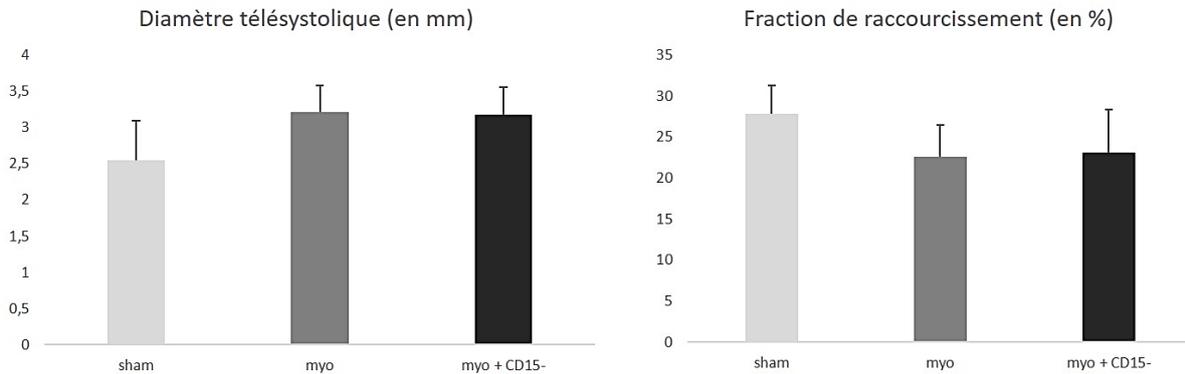


Figure 26 : Analyses de la fonction cardiaque par échocardiographie transthoracique trois semaines après l'implantation de feuilles de myoblastes ou de feuilles composites (sacrifice). Le diamètre du ventricule gauche en fin de systole (ou diamètre télésystolique) ainsi que la fraction de raccourcissement ont été déterminés.

Malgré ces résultats non-concluants, une analyse de l'expression de plusieurs gènes liés à l'insuffisance cardiaque comme la chaîne lourde de la myosine bêta (MHCb1), le peptide natriurétique cérébral (BNP), le facteur d'induction à l'hypoxie (HIF1a) et la protéine morphogénétique osseuse (BMP4) a été effectuée (Figure 27). Une diminution non significative des gènes de β -MHC, BNP, HIF1a et BMP4 a été observée. La différence entre les groupes traités et non traités étant très faible concernant les gènes BNP, HIF1a et BMP4, il est possible de conclure sur l'absence d'effet des implantations des feuilles de myoblastes seuls ou associés aux progéniteurs cardiaques. En revanche, les feuilles de cellules n'entraînent pas non plus de dégradation significative de la fonction cardiaque. La différence entre les feuilles de myoblastes et les feuilles mixtes semble nulle, ce qui est corrélé avec l'absence des progéniteurs cardiaques observée après trois semaines de greffe.

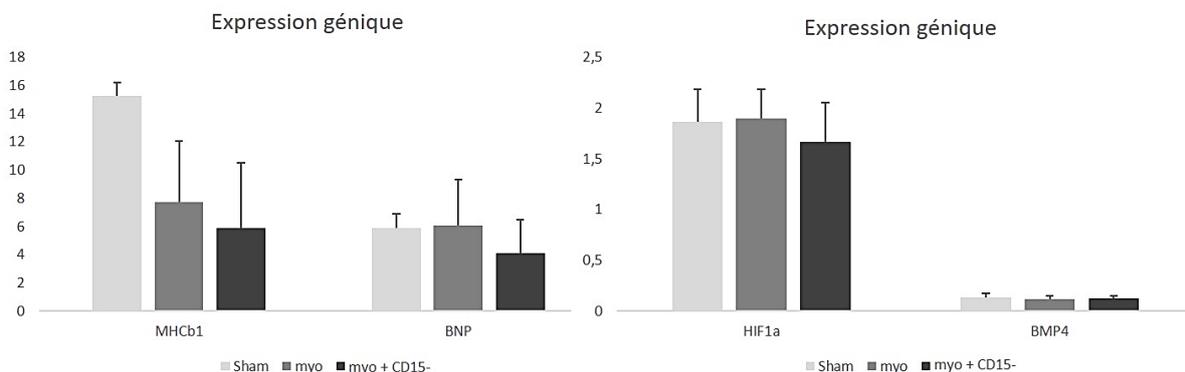


Figure 27 : Quantification relative des niveaux d'ARNm par PCR en temps réel pour différents gènes liés à l'insuffisance cardiaque : MHCb1 : chaîne lourde de la myosine bêta 1 ; BNP : peptide natriurétique cérébral, HIF1a : facteur d'induction à l'hypoxie 1a et BMP4 : protéine morphogénétique osseuse.

Conclusion

L'utilisation de feuilles composites de cellules nourricières et de progéniteurs cardiaques est une stratégie prometteuse. Pour être conduite avec succès, cette stratégie présuppose l'utilisation des feuilles de cellules qui serviraient de support aux cellules d'intérêt et auraient un effet bénéfique sur la fonction cardiaque via, notamment, des effets paracrines par production importante de cytokines tout en permettant la co-culture avec les cellules d'intérêt.

Les résultats détaillés dans ce chapitre ont démontré que la greffe épiscopardique de feuilles constituées d'ADSC permettait bien une stabilisation de la fonction ventriculaire dans un modèle murin de cardiomyopathie dilatée par invalidation génétique conditionnelle du gène SRF. Cette amélioration fonctionnelle est principalement induite par la sécrétion de biofacteurs cardioprotecteurs par les ADSC greffées, qui activent les voies de réparation cardiaque notamment par un contrôle du remodelage fibrotique. Cependant, la co-culture *in vitro* de ces feuilles d'ADSC et de progéniteurs cardiovasculaires dérivés de cellules souches embryonnaires murines n'a pas été possible.

Nous avons donc choisi, dans un deuxième temps d'utiliser des feuilles de myoblastes comme support des progéniteurs cardiaques pour la greffe épiscopardique. La co-culture *in vitro* de ces deux types cellulaires s'est avérée possible. Cependant la greffe épiscopardique des feuilles composites n'a pas donné, dans cette étude, les résultats escomptés. En effet, non seulement aucune amélioration significative de la fonction cardiaque des animaux greffés n'a pu être mise en évidence, mais de surcroît, les progéniteurs cardiaques n'ont pas été retrouvés 3 semaines après la greffe.

Ces deux études sur les feuilles de cellules ont permis de montrer l'intérêt *in vivo* des feuilles d'ADSC en comparaison des feuilles de myoblastes pour la fonction cardiaque. Elle a aussi démontré la supériorité des myoblastes en ce qui concerne la co-culture *in vitro* avec les progéniteurs cardiaques. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence une population de cellules qui réunit ces deux facteurs critiques.

Enfin, nous avons également observé que la maniabilité réduite des feuilles est très contraignante pour la greffe épiscopardique. Leur finesse induit une fragilité importante et donc augmente la difficulté à être implantée. Or il est très difficile de moduler les paramètres physico-chimiques d'une feuille constituée uniquement de cellules (et de matrice extracellulaire produite par ces cellules) comme la rigidité, la rétention et l'enchevêtrement des cellules d'intérêt.

Discussion et perspectives

Les cardiopathies non-ischémiques contribuent largement au nombre de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Hershberger, Morales, et Siegfried 2010). La thérapie cellulaire a historiquement été testée dans des modèles de cardiopathie ischémique même si des études précédentes ont été menées sur des modèles génétiques ou médicamenteux de cardiopathies. Ainsi, l'utilisation de myoblastes squelettiques (Pouly et al. 2004), de cellules dérivées de la moelle osseuse (Agbulut et al. 2003) ou encore de cellules souches embryonnaires (Yamada et al. 2008) a apporté des preuves préliminaires de l'efficacité fonctionnelle de cette approche pour les cardiopathies non-ischémiques.

Notre étude a permis de confirmer cette efficacité et a démontré que notre approche permettait une stabilisation de la fonction contractile chez la souris transgénique déficiente en SRF (Serum Response Factor) en réduisant la dilatation ventriculaire. SRF est un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes impliqués dans la croissance, la prolifération, la différenciation et le cytosquelette d'actine. Une forme tronquée et anormale de cette protéine a été retrouvée dans le cœur de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Davis et al. 2002). L'inactivation conditionnelle de SRF en utilisant la stratégie Cre/Lox dans le cœur a montré que SRF est essentiel pour la différenciation cardiaque et la maturation durant l'embryogénèse et la période post-natale (Parlakian et al. 2004 ; Gary-Bobo et al. 2008). Dans notre étude nous avons utilisé un modèle de souris double transgénique qui permet d'induire l'inactivation de SRF seulement dans les cardiomyocytes car l'expression de la Cre-recombinase est sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde alpha de la myosine, une protéine spécifiquement exprimée dans les cardiomyocytes (Parlakian et al. 2005). Cinq jours après l'injection du tamoxifène il y a une diminution totale de l'ARNm de SRF dans les cardiomyocytes. La souris subit alors une altération progressive de sa fonction cardiaque, une réduction du flux d'énergie aux myofibrilles et une contractilité diminuée. Cela induit alors une cardiopathie dilatée, une insuffisance et la mort des animaux dans les 10 semaines suivant l'injection. Ce modèle, très intéressant, est le premier à notre connaissance qui permet de contrôler précisément la temporalité d'apparition du phénotype (une fois le tamoxifène injecté) permettant une standardisation qui autorise la comparaison des groupes traités et non-traités de manière plus aisée.

D'un point de vue mécanistique nos résultats suggèrent que les cellules transplantées agissent principalement via une signalisation paracrine (Maltais et al. 2010). Ainsi nous n'avons pas pu observer une régénération du myocarde de la part de cellules transplantées. Cependant il est connu que les cellules ADSC expriment de nombreuses molécules angiogéniques et anti-apoptotiques (Rehman et al. 2004). Des résultats d'ELISA ont en effet montré que les ADSC utilisées, sécrétaient un large spectre de molécules angiogéniques et anti-fibrotiques. Ainsi, la réduction de la fibrose observée pourrait être induite par ces cytokines (notamment IGF-1 et HGF, (Touvron

et al. 2012 ; Okayama et al. 2012)) ce qui pourrait ainsi influencer favorablement la préservation de la géométrie et de la fonction ventriculaire.

Les myoblastes peuvent aussi agir via l'activation de voies de signalisations paracrines (Perez-Illarbe et al. 2008). Des feuilles de myoblastes ont donc fait l'objet d'une étude exploratoire afin de déterminer si elles pouvaient être aussi efficaces que les ADSC. Cependant, ces feuilles de cellules n'ont pas démontré de capacité supérieure aux ADSC, démontrant que les cellules souches dérivées du tissu adipeux ont un potentiel intéressant pour la thérapie cellulaire si on considère que l'objectif n'est pas de régénérer le cœur grâce à la formation de nouveaux cardiomyocytes mais principalement via la sécrétion de biofacteurs cardioprotecteurs. Cette stratégie a déjà démontré des bénéfices fonctionnels dans des modèles animaux de petites tailles (Mazo et al. 2008) ou de grandes tailles (Valina et al. 2007). Des essais cliniques sont actuellement en cours pour tester ces cellules dans le contexte de l'ischémie cardiaque chronique ou aiguë. Cependant en considérant que la thérapie cellulaire cardiaque a pour objectif le remplacement des cardiomyocytes du cœur, utiliser les ADSC ou les myoblastes comme support de cellules cardiogéniques (comme les progéniteurs cardiovasculaires) semble plus prometteur.

Nos résultats ont ainsi montré que les feuilles de cellules sont présentes assez longtemps (3 semaines) après implantation ce qui montre que cette technique peut permettre un traitement de longue durée, permettant par exemple aux cellules cardiogéniques de proliférer, de migrer et de se différencier dans le myocarde. La présence d'une feuille de cellules support pourrait également permettre de sécréter des facteurs cardioprotecteurs le temps que les cellules cardiogéniques régénèrent le myocarde.

Cependant, dans cette étude, aucun progéniteur cardiovasculaire n'a été retrouvé en utilisant des feuilles d'ADSC *in vitro*. Par contre ces cellules ont été cultivées avec succès sur des feuilles de myoblastes. Elles n'ont cependant pas été retrouvées après implantation en utilisant ces feuilles de myoblastes.

Malgré cela, notre étude montre que la greffe épiscopardique, en recouvrant le myocarde avec le greffon, dans le contexte d'un modèle de cardiopathie dilatée génétique est une approche intéressante. Il faut cependant reconnaître que la manipulation des feuilles de cellules est très délicate et serait difficilement transposable à une utilisation clinique. Il serait ainsi plus efficace et pratique d'utiliser à la place des feuilles de cellules un biomatériau ayant des propriétés mécaniques plus adaptées à la greffe épiscopardique. De plus, l'utilisation de cellules cardiaques plus matures pourraient s'avérer plus efficace. En effet les progéniteurs cardiovasculaires ne sont pas pleinement engagés dans la voie cardiaque. Ils sont de plus très fragiles et par exemple, nécessitent l'utilisation de cellules nourricières ou d'une matrice d'enrobage (comme un hydrogel de fibrine par exemple) afin d'être utilisés pour une greffe épiscopardique. Ces développements sont à l'origine du projet principal de ma thèse décrit dans le chapitre suivant.

Bibliographie du chapitre 1

- Agbulut, Onnik, Marie-Laurence Menot, Zhenlin Li, Françoise Marotte, Denise Paulin, Albert A. Hagège, Christine Chomienne, Jane-Lyse Samuel, et Philippe Menasché. 2003. « Temporal Patterns of Bone Marrow Cell Differentiation Following Transplantation in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy ». *Cardiovascular Research* 58 (2): 451-59.
- Bartunek, Jozef, Atta Behfar, Dariouch Dolatabadi, Marc Vanderheyden, Miodrag Ostojic, Jo Dens, Badih El Nakadi, 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 ». *Journal of the American College of Cardiology* 61 (23): 2329-38. doi:10.1016/j.jacc.2013.02.071.
- Bel, Alain, Valérie Planat-Bernard, Atsuhiko Saito, Lionel Bonnevie, Valérie Bellamy, Laurent Sabbah, Linda Bellabas, et al. 2010. « Composite Cell Sheets ». *Circulation* 122 (11 suppl 1): S118-23. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927293.
- Crisostomo, Paul R., Aaron M. Abarbanell, Meijing Wang, Tim Lahm, Yue Wang, et Daniel R. Meldrum. 2008. « Embryonic Stem Cells Attenuate Myocardial Dysfunction and Inflammation after Surgical Global Ischemia via Paracrine Actions ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (4): H1726-1735. doi:10.1152/ajpheart.00236.2008.
- Davis, Francesca J., Madhu Gupta, Steven M. Pogwizd, Emile Bacha, Valluan Jeevanandam, et Mahesh P. Gupta. 2002. « Increased Expression of Alternatively Spliced Dominant-Negative Isoform of SRF in Human Failing Hearts ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 282 (4): H1521-1533. doi:10.1152/ajpheart.00844.2001.
- Gary-Bobo, Guillaume, Ara Parlakian, Brigitte Escoubet, Claudio Areias Franco, Sophie Clément, Patrick Bruneval, David Tuil, et al. 2008. « Mosaic Inactivation of the Serum Response Factor Gene in the Myocardium Induces Focal Lesions and Heart Failure ». *European Journal of Heart Failure* 10 (7): 635-45. doi:10.1016/j.ejheart.2008.04.014.
- Gerbin, Kaytlyn A., Xiulan Yang, Charles E. Murry, et Kareen L. K. Coulombe. 2015. « Enhanced Electrical Integration of Engineered Human Myocardium via Intramyocardial versus Epicardial Delivery in Infarcted Rat Hearts ». *PLoS ONE* 10 (7). doi:10.1371/journal.pone.0131446.
- Gimble, Jeffrey M., Adam J. Katz, et Bruce A. Bunnell. 2007. « Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine ». *Circulation Research* 100 (9): 1249-60. doi:10.1161/01.RES.0000265074.83288.09.
- Hamdi, Hadhami, Solène Emmanuelle Boitard, Valérie Planat-Benard, Julia Pouly, Hany Neamatalla, Pierre Joanne, Marie-Cécile Perier, et al. 2013. « Efficacy of Epicardially Delivered Adipose Stroma Cell Sheets in Dilated Cardiomyopathy ». *Cardiovascular Research* 99 (4): 640-47. doi:10.1093/cvr/cvt149.
- Hamdi, Hadhami, Akira Furuta, Valérie Bellamy, Alain Bel, Etienne Puymirat, Séverine Peyrard, Onnik Agbulut, et Philippe Menasché. 2009. « Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison ». *The Annals of Thoracic Surgery* 87 (4): 1196-1203. doi:10.1016/j.athoracsur.2008.12.074.
- Hamdi, Hadhami, Valérie Planat-Benard, Alain Bel, Etienne Puymirat, Raghed Geha, Laetitia Pidal, Hany Nematalla, et al. 2011. « Epicardial Adipose Stem Cell Sheets Results in Greater Post-Infarction Survival than Intramyocardial Injections ». *Cardiovascular Research* 91 (3): 483-91. doi:10.1093/cvr/cvr099.
- Harding, John, R Michael Roberts, et Oleg Mirochnitchenko. 2013. « Large animal models for stem cell therapy ». *Stem Cell Research & Therapy* 4 (2): 23. doi:10.1186/scr171.
- Hazebroek, M., R. Dennert, et S. Heymans. 2012. « Idiopathic dilated cardiomyopathy: possible triggers and treatment strategies ». *Netherlands Heart Journal* 20 (7-8): 332-35. doi:10.1007/s12471-012-0285-7.
- Hershberger, Ray E., Ana Morales, et Jill D. Siegfried. 2010. « Clinical and Genetic Issues in Dilated Cardiomyopathy: A Review for Genetics Professionals ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 12 (11): 655-67. doi:10.1097/GIM.0b013e3181f2481f.
- Hershberger, Ray E., et Jill D. Siegfried. 2011. « Update 2011: Clinical and Genetic Issues in Familial Dilated Cardiomyopathy ». *Journal of the American College of Cardiology* 57 (16): 1641-49. doi:10.1016/j.jacc.2011.01.015.
- Li, Tao-Sheng, Ke Cheng, Konstantinos Malliaras, Rachel Ruckdeschel Smith, Yiqiang Zhang, Baiming Sun, Noriko Matsushita, et al. 2012. « Direct Comparison of Different Stem Cell Types and Subpopulations Reveals Superior Paracrine Potency and Myocardial Repair Efficacy with Cardiosphere-Derived Cells ». *Journal of the American College of Cardiology* 59 (10): 942-53. doi:10.1016/j.jacc.2011.11.029.
- Malliaras, Konstantinos, Raj R. Makkar, Rachel R. Smith, Ke Cheng, Edwin Wu, Robert O. Bonow, Linda Marbán, 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) ». *Journal of the American College of Cardiology* 63 (2): 110-22. doi:10.1016/j.jacc.2013.08.724.
- Maltais, Simon, Jacques P. Tremblay, Louis P. Perrault, et Hung Q. Ly. 2010. « The Paracrine Effect: Pivotal Mechanism in Cell-Based Cardiac Repair ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3 (6): 652-62. doi:10.1007/s12265-010-9198-2.
- Mazo, Manuel, Valérie Planat-Bénard, Gloria Abizanda, Beatriz Pelacho, Bertrand Léobon, Juan José Gavira, Iván Peñuelas, et al. 2008. « Transplantation of Adipose Derived Stromal Cells Is Associated with Functional Improvement in a Rat Model of Chronic Myocardial Infarction ». *European Journal of Heart Failure* 10 (5): 454-62. doi:10.1016/j.ejheart.2008.03.017.
- Ménard, Claudine, Albert A. Hagège, Onnik Agbulut, Marietta Barro, Miguel Cortes Morichetti, Camille Brasselet, Alain Bel, et al. 2005. « Transplantation of Cardiac-Committed Mouse Embryonic Stem Cells to Infarcted Sheep Myocardium: A Preclinical Study ». *Lancet (London, England)* 366 (9490): 1005-12. doi:10.1016/S0140-6736(05)67380-1.
- Menasché, Philippe, Ottavio Alfieri, Stefan Janssens, William McKenna, Hermann Reichenspurner, Ludovic Trinquart, Jean-Thomas Vilquin, et al. 2008. « The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial: First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation ». *Circulation* 117 (9): 1189-1200. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734103.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Isabelle Cacciapuoti, Alexandre Parouchev, et al. 2015. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors for Severe Heart Failure Treatment: First Clinical Case Report ». *European Heart Journal* 36 (30): 2011-17. doi:10.1093/eurheartj/ehv189.
- Mestroni, Luisa, Francesca Brun, Anita Spezzacatene, Gianfranco Sinagra, et Matthew RG Taylor. 2014. « GENETIC CAUSES OF DILATED CARDIOMYOPATHY ». *Progress in pediatric cardiology* 37 (1-2): 13-18. doi:10.1016/j.ppedcard.2014.10.003.
- Okayama, Keita, Junya Azuma, Norio Dosaka, Kazuma Iekushi, Fumihiko Sanada, Hiroshi Kusunoki, Masaaki Iwabayashi, Hiromi Rakugi, Yoshiaki Taniyama, et Ryuichi Morishita. 2012. « Hepatocyte Growth Factor Reduces Cardiac Fibrosis by Inhibiting Endothelial-Mesenchymal Transition ». *Hypertension* 59 (5): 958-65. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.183905.
- Ou, Lailiang, Wenzhong Li, Yi Liu, Yue Zhang, Shen Jie, Deling Kong, Gustav Steinhoff, et Nan Ma. 2010. « Animal Models of Cardiac Disease and Stem Cell Therapy ». *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 4 (novembre): 231-39. doi:10.2174/1874192401004010231.
- Pal, Rajarshi. 2009. « Embryonic Stem (ES) Cell-Derived Cardiomyocytes: A Good Candidate for Cell Therapy Applications ». *Cell Biology International* 33 (3): 325-36. doi:10.1016/j.cellbi.2008.12.001.
- Parlakian, Ara, Claude Charvet, Brigitte Escoubet, Mathias Mericskay, Jeffery D. Molkentin, Guillaume Gary-Boob, Leon J. De Windt, et al. 2005. « Temporally Controlled Onset of Dilated Cardiomyopathy through Disruption of the SRF Gene in Adult Heart ». *Circulation* 112 (19): 2930-39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778.
- Parlakian, Ara, David Tuil, Ghislaine Hamard, Geneviève Tavernier, Daniele Hentzen, Jean-Paul Concordet, Denise Paulin, Zhenlin Li, et Dominique Daegelen. 2004. « Targeted Inactivation of Serum Response Factor in the Developing Heart Results in Myocardial Defects and Embryonic Lethality ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (12): 5281-89. doi:10.1128/MCB.24.12.5281-5289.2004.
- Perez-Illarbe, Maitane, Onnik Agbulut, Beatriz Pelacho, Cristina Ciorba, Ederne San Jose-Eneriz, Michel Desnos, Albert A. Hagège, et al. 2008. « Characterization of the Paracrine Effects of Human Skeletal Myoblasts Transplanted in Infarcted Myocardium ». *European Journal of Heart Failure* 10 (11): 1065-72. doi:10.1016/j.ejheart.2008.08.002.
- Planat-Bénard, Valérie, Jean-Sébastien Silvestre, Béatrice Cousin, Mireille André, Maryse Nibbelink, Radia Tamarat, Michel Clergue, et al. 2004. « Plasticity of Human Adipose Lineage Cells toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives ». *Circulation* 109 (5): 656-63. doi:10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61.
- Pouly, Julia, Albert A. Hagège, Jean-Thomas Vilquin, Alvine Bissery, Andrée Rouche, Patrick Bruneval, Denis Duboc, et al. 2004. « Does the Functional Efficacy of Skeletal Myoblast Transplantation Extend to Nonischemic Cardiomyopathy? ». *Circulation* 110 (12): 1626-31. doi:10.1161/01.CIR.0000142861.55862.15.
- Rehman, Jalees, Dmitry Traktuev, Jingling Li, Stephanie Merfeld-Clauss, Constance J. Temm-Grove, Jason E. Bovenkerk, Carrie L. Pell, Brian H. Johnstone, Robert V. Considine, et Keith L. March. 2004. « Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells ». *Circulation* 109 (10): 1292-98. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1.

- Shimizu, Tatsuya, Masayuki Yamato, Yuki Isoi, Takumitsu Akutsu, Takeshi Setomaru, Kazuhiko Abe, Akihiko Kikuchi, Mitsuo Umezu, et Teruo Okano. 2002. « Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces ». *Circulation Research* 90 (3): e40.
- Shimizu, Tatsuya, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, et Teruo Okano. 2003. « Cell Sheet Engineering for Myocardial Tissue Reconstruction ». *Biomaterials* 24 (13): 2309-16.
- Touvron, Melissa, Brigitte Escoubet, Mathias Mericskay, Aude Angelini, Luciane Lamotte, Maria Paola Santini, Nadia Rosenthal, Dominique Daegelen, David Tuil, et Jean-François Decaux. 2012. « Locally Expressed IGF1 Propeptide Improves Mouse Heart Function in Induced Dilated Cardiomyopathy by Blocking Myocardial Fibrosis and SRF-Dependent CTGF Induction ». *Disease Models & Mechanisms* 5 (4): 481-91. doi:10.1242/dmm.009456.
- Valina, Christian, Kai Pinkernell, Yao-Hua Song, Xiaowen Bai, Sanga Sadat, Richard J. Campeau, Thierry H. Le Jemtel, et Eckhard Alt. 2007. « Intracoronary Administration of Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells Improves Left Ventricular Function, Perfusion, and Remodelling after Acute Myocardial Infarction ». *European Heart Journal* 28 (21): 2667-77. doi:10.1093/eurheartj/ehm426.
- Yamada, Satsuki, Timothy J. Nelson, Ruben J. Crespo-Diaz, Carmen Perez-Terzic, Xiao-Ke Liu, Takashi Miki, Susumu Seino, Atta Behfar, et Andre Terzic. 2008. « Embryonic Stem Cell Therapy of Heart Failure in Genetic Cardiomyopathy ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (10): 2644-53. doi:10.1634/stemcells.2008-0187.

Chapitre 2 : Développement d'une matrice en nanofibres de collagène supportant des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines pour le traitement des cardiomyopathies dilatées

Introduction et présentation du projet

Les travaux précédents ont permis de mettre en évidence les nombreux avantages de l'utilisation de feuilles de cellules dans un modèle murin de cardiomyopathie dilatée. En effet, les feuilles de cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux (ou myoblastes) ne nécessitent aucune matrice ni support pour se développer et sont capables d'adhérer facilement sur le cœur. Néanmoins, la maniabilité pendant la greffe est complexe et délicate, ces feuilles de cellules étant très fragiles. La greffe est donc particulièrement difficile et la manipulation de la feuille peut facilement entraîner sa déchirure. De plus, la nécessité d'associer aux précurseurs cardiaques des cellules nourricières de support pose le problème des co-cultures entre deux populations de cellules très différentes (*cf travaux sur les feuilles d'ADSC*). Même si l'association entre les myoblastes et les cellules souches embryonnaires de souris a été possible, aucun précurseur cardiaque n'a été retrouvé après la greffe. On peut déduire de ces résultats que la technologie des feuilles de cellules est intéressante dans le cas où les cellules d'intérêt peuvent se cultiver de manière confluite sans cellules de support. Cette approche est cependant limitée dans notre cas comme l'a bien démontré notre étude. Cependant, pour apporter des cellules au cœur, un support physique est nécessaire afin de faciliter la greffe et d'améliorer la survie des cellules greffées.

Dans ce cadre, nous avons choisi de développer une autre stratégie en utilisant une autre technologie comme support de cellules à greffer : les biomatériaux. Il existe de nombreux biomatériaux et l'une des principales considérations dont nous avons tenu compte dans le développement de notre nouvelle stratégie est le rôle du biomatériau comme environnement propice à l'orientation de la différenciation et de la survie cellulaire. Ainsi nous avons choisi un matériau aussi biomimétique que possible : le collagène. Il s'agit de la protéine la plus abondante de la matrice extracellulaire cardiaque. Nous avons donc supposé que cette protéine serait idéale pour poser les bases d'un biomatériau biomimétique qui permettrait d'améliorer la survie et la fonctionnalité des cellules greffées. C'est également un polymère hautement biocompatible qui n'induit que peu de rejet immunitaire. Afin d'effectuer une recherche translationnelle, et dans une finalité clinique, nous avons choisi de travailler majoritairement avec des solutions et molécules cliniquement approuvées. Ainsi, nous avons sélectionné un collagène cliniquement approuvé qui sera électrospinné afin de former un film de nanofibres de collagène sur lequel peuvent être ensemencées les cellules d'intérêt.

Dans un deuxième temps nous avons également choisi d'utiliser des cellules ayant un stade de maturation plus important pour la thérapie cellulaire cardiaque. En effet, dans l'étude précédente, des précurseurs cardiaques dérivés des cellules souches pluripotentes humaines ont été utilisés. Ces cellules sont particulièrement délicates à utiliser dans le cadre d'une approche par ensemencement d'un biomatériau car elles ont une adhérence très limitée sur les différents substrats qui ont été testés

dans le laboratoire de Jérôme Larghero qui produit ces cellules pour l'essai clinique mené par le Pr. Menasché (résultats non montrés). Nous avons donc choisi d'utiliser des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines qui présentent également l'avantage d'être des cellules cardiaques fonctionnelles qui sont donc moins susceptibles de différencier vers un autre lignage cellulaire.

Cette nouvelle stratégie constitue le principal axe de recherche de mon projet doctoral. Mon travail a donc ainsi consisté à participer au développement d'un nouveau produit de thérapie cellulaire composé d'une matrice en collagène supportant des cellules souches humaines pluripotentes dérivées en cardiomyocytes.

1. Le collagène

D'un point de vue moléculaire, le collagène natif est composé de 3 chaînes polypeptidiques en hélice alpha qui sont enroulées les unes avec les autres (*Figure 28*).

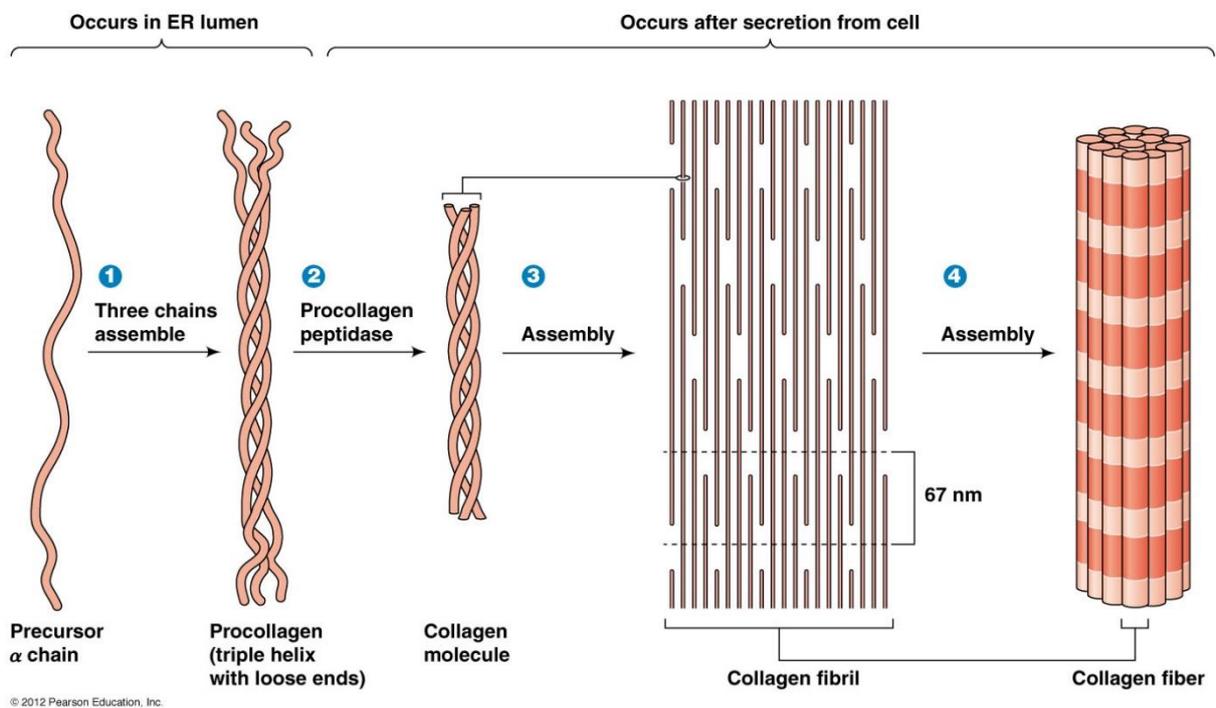


Figure 28: Les différentes étapes de l'assemblage des fibres de collagène.

Le collagène est synthétisé dans le cœur par les fibroblastes cardiaques sous la forme de procollagène soluble. Il est ensuite mûré par des enzymes spécifiques qui clivent les propeptides en N- et C-terminal du procollagène. Cela démasque les télopeptides qui permettent la fibrillation du collagène. Il peut ensuite s'auto-assembler et s'associer avec les autres protéines de la matrice extracellulaire (Kadler et al. 1996). Ainsi, la protéine la plus abondante de la matrice extracellulaire du cœur est le collagène qui forme un réseau de fibres élastiques. Ces fibres sont constituées à 80% par du collagène de type I et à 10% par du collagène de type III dans un cœur sain (Kassiri et Khokha 2005; Medugorac et Jacob 1983). Le réseau de collagène connecte les myocytes entre eux via des connexions avec des intégrines afin de maintenir

l'alignement et la compaction de ces cellules (Robinson et al. 1987). Ce réseau assure ainsi le maintien de l'intégrité structurale du myocarde, sa rigidité et participe à la transmission des forces (Jalil et al. 1989). La modulation de la synthèse et de la dégradation du collagène dans le myocarde a des effets drastiques sur les forces développées par celui-ci, sa rigidité, sa relaxation et même ses propriétés de conduction électrique (Nguyen et al. 2010). Une forte synthèse de collagène est également observée au moment de la formation de la cicatrice fibreuse suite à un infarctus, ce qui permet d'empêcher la rupture du myocarde (Schellings et al. 2009). En plus de ces rôles démontrés dans le cœur, il a également été démontré que le collagène améliorait l'adhésion et la survie de cellules souches mésenchymateuses (Somaiah et al. 2015). Le collagène possède également une très faible immunogénicité (Lynn, Yannas, et Bonfield 2004) et possède aussi des propriétés hémostatiques (Spector et al. 2011). Pour toutes ces caractéristiques, ce polymère naturel résorbable et biocompatible est donc très intéressant dans le cadre de la thérapie cellulaire.

Plusieurs études de thérapie cellulaire cardiaque ont ainsi utilisé le collagène comme biomatériau comme indiqué dans la *Figure 29*. En 2009, Dai et al., (Dai et al. 2009) ont démontré qu'un hydrogel de collagène permettait de limiter la diffusion de cellules souches mésenchymateuse dans le cadre de la thérapie cellulaire cardiaque. Plus récemment, Nakajima et al., (Nakajima et al. 2015) ont montré que l'utilisation d'un hydrogel de gélatine en combinaison avec des cardiomyocytes de rats fœtaux dans un modèle d'infarctus chez le rat améliorait significativement l'effet du traitement comparativement à l'utilisation de cardiomyocytes seuls (la gélatine n'est autre que du collagène dénaturé). L'équipe de Murry a montré en 2011 qu'il était possible d'implanter chez le rat un micro-tissu cardiaque constitué d'un hydrogel de collagène, de cellules endothéliales et de cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines (Tulloch et al. 2011). Ce micro-tissu, greffé sur le cœur est alors perfusé par un réseau de capillaires émanant des coronaires de l'hôte. Précédemment, cette stratégie basée sur l'ingénierie tissulaire cardiaque avait également été démontrée, avec des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, par l'équipe d'Eschenhagen (Zimmermann et al. 2006).

Table. Summary of Studies

		Cell Lines and Other Components	References	Summary/Observations
Natural scaffolds	Collagen	Neonatal rat heart cells	Souren et al ^{27,28}	Floating collagen layers were used as a matrix for CM seeding and studies of myocyte contractile behavior
			Zimmermann et al ²⁹	First introduction of EHTs from neonatal rat CMs in collagen/Matrigel matrix mixtures and demonstration of the importance of mechanical loading
			Zimmermann et al ³⁰	3D EHTs show morphological, ultrastructural, and function properties of native myocardium and show distinct responses to growth factor stimulation
			Naito et al ³¹	The nonmyocytes and, in particular, fibroblasts are important for optimal EHT function and capillarization; Matrigel can be replaced by insulin and T3; fusion of individual EHTs can be used to generate large tissue patches
			Tiburcy et al ³²	Immature CMs terminally differentiate and reach a postnatal degree of mature in EHTs
			Zimmermann et al ²⁰	EHTs are quickly capillarized and innervated after implantation
			Zimmermann et al ²³	Multiloop EHTs can be used to enhance contractile performance of infarcted rat hearts
		Fetal rat heart cells	Li et al ²⁴	Cardiomyocytes can be seeded on gelatin sponge (Gelfoam); implanted grafts remain viable
		Chick embryo heart cells	Eschenhagen et al ³³	First introduction of CMPMs from embryonic chick cardiomyocytes in collagen gels
			Fink et al ³⁴	Stretching of EHTs induces hypertrophy and functional improvement
		Mouse embryonic stem cells	Guo et al ³⁵	Use of mouse embryonic stem cells as cardiomyocyte source for EHT construction demonstrated
		Mouse parthenogenetic stem cells	Didié et al ³⁶	Use of mouse PSCs as cardiomyocyte source for EHM construction demonstrated; proof-of-concept for the use of PSC-EHM in heart repair
		Human embryonic and induced pluripotent stem cells	Tulloch et al ³⁷	Human EHTs generated and cardiomyocyte proliferation observed
			Soong et al ³⁸	Human EHTs generated under serum-reduced conditions
			Streckfuss-Bömeke et al ³⁹	Different iPSC sources for cardiomyocyte derivation and EHT construction
Rat MSCs	Maureira et al ⁴⁰	Contractility↑, perfusion↑, infarct size↓		

Figure 29 : Les différentes études utilisant le collagène comme biomatériau.

Nous avons choisi de travailler à partir d'atélocollagène car c'est un collagène qui n'est plus capable de fibriller. L'atélocollagène est une molécule de 300 kDa qui est obtenue par digestion peptidique du tropocollagène pour éliminer les télopeptides responsables de la majeure partie de l'antigénicité du tropocollagène. Il est aussi plus soluble et permet d'obtenir une solution beaucoup plus concentrée en collagène ce qui est primordial pour la technique d'électrospinning. L'atélocollagène utilisé est extrait puis purifié à partir de tissu de peau porcine. Cet atélocollagène de grade clinique sous format sec, après lyophilisation, a été fournis par Biom'Up (Saint-Priest, France). L'entreprise Biom'Up® (Lyon, France) est spécialisée dans le développement et la production de matrice en collagène pour diverses utilisations dans le milieu médical. Le collagène produit par cette entreprise est un collagène cliniquement approuvé ce qui permettra, dans un avenir plus ou moins proche, une utilisation des patchs en nanofibres de collagène en médecine humaine.

2. Les biomatériaux et la technique d'électrospinning :

Les patches sont couramment utilisés comme supports structurels et fonctionnels, sur lesquels les cellules sontensemencées pour la génération de produits de thérapie cellulaire. Dans le domaine de la thérapie cardiaque cette approche est difficile mais très prometteuse pour améliorer la fonction cardiaque, après une défaillance chronique myocardique (Menasché et al. 2015). Différents types de biomatériaux ont été développés dont les hydrogels et les nanostructures, obtenus à partir de polymères synthétiques (acide polyglycolide ou PGA, acide polylactique ou PLA, polyglycérolé sébacate ou PGS, polyéthylène glycol ou PEG, polycaprolactone ou PCL) ou naturels (soie, collagène, chitosane, fibrine, alginate, acide hyaluronique, gélatine) ; mais également des feuilles de cellules ou des matrices décellularisées (cf Introduction générale). Les matrices nanostructurées peuvent être obtenues par association de fibres, tubes, anneaux ou fils. Grâce à leur grande surface et leur porosité élevée, les matrices en nanofibres ont été utilisées dans de nombreux domaines. De nombreuses techniques existent pour la fabrication de ces matrices en nanofibres : auto-assemblage moléculaire, déposition atomique (ou ALD), croissance cristalline anisotrope, ou imprimante 3D. L'une des techniques les plus simples et les plus modulables pour générer des nanofibres est la technique de l'électrospinning. Les matrices en nanofibres électrospinnées peuvent être étudiées à différentes échelles. D'un point de vue moléculaire, les nanofibres permettent de mimer les interactions entre les cellules et leur microenvironnement (la matrice extracellulaire notamment), elles peuvent être associées à d'autres nanofibres de différentes matières/structures pour moduler la différenciation cellulaire ou à diverses molécules ou charges ioniques pour potentialiser la prolifération et la migration cellulaire et réduire les infections par réduction de l'invasion bactérienne. A une échelle intermédiaire, les matrices en nanofibres électrospinnées ont une capacité de modulation mécanique avec un impact sur le destin cellulaire, créent un support physique pour le remodelage tissulaire, et peuvent servir à délivrer des cellules ou des régulateurs solubles, à maintenir un environnement chimique ou une niche pour la survie et la différenciation cellulaire. D'un point de vue macroscopique, ces matrices sont capables de mimer un tissu avec des multifonctions intégratives pour limiter la perte ou la pathologie tissulaire.

L'équipe de Vacanti a été pionnière pour utiliser une matrice nanofibreuse par électrospinning du polycaprolactone) (PCL) supportant des cardiomyocytes de rats nouveau-nés pour la réparation myocardique (Shin et al. 2004). Auparavant, un grand nombre d'études a été consacré à la culture des cellules cardiaques à l'aide de matrices à base de polymères synthétiques. En particulier, les matrices en nanofibres obtenues par électrospinning de PLA et PCL pourraient être utilisées pour l'obtention de couches de cellules cardiaques fonctionnelles (Castellano et al. 2014).

Toutefois, en raison du manque d'affinité cellulaire, ces polymères synthétiques sont moins attractifs que les polymères naturels – tels que le collagène, le fibrinogène ou l'élastine – pour des applications *in vivo* (Sell et al. 2009). Parmi eux, le collagène

constitue l'une des principales protéines de la matrice extracellulaire, ce qui permet aux matrices en collagène de ressembler de manière très proche à la structure fibrillaire naturelle du tissu cardiaque (Corda, Samuel, et Rappaport 2000).

En conséquence, il est intéressant de considérer les matrices en nanofibres de collagène électrospinnées comme supports mécaniques pour le myocarde et comme support physiologique pour les cellules cardiaques à implanter dans le but de réparer le myocarde défaillant (Matthews et al. 2002). Différents types de collagène cliniquement approuvé sont disponibles à la vente mais la possibilité d'obtention des matrices fibreuses à partir de ces différents collagènes n'a pas encore été démontrée. Une des principales problématiques est le processus de réticulation des nanofibres qui nécessite l'utilisation de réactifs chimiques pour rendre les structures fibreuses stables dans le milieu de culture et après l'implantation. L'agent pontant le plus utilisé pour ponter les fibres de collagène est le glutaraldéhyde – bien connu pour son efficacité mais quelque peu toxique. Il existe également une combinaison de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide hydrochloride (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS) qui est moins toxique que le glutaraldéhyde mais crée souvent le dépôt d'une fine pellicule après l'immersion des fibres dans l'eau (Huang et al. 2015 ; Dong et al. 2009). Par ailleurs, un système basé sur le pontage des fibres avec de l'acide citrique (CA) a été récemment utilisé et démontre une bonne biocompatibilité (Jiang et al. 2013). Dans ce travail, nous avons déterminé les différents paramètres d'électrospinning et de dissolution du collagène cliniquement approuvé afin de produire une matrice de collagène optimale pour la culture en trois dimensions des cellules cardiaques mais également pour une utilisation dans un but thérapeutique dans un premier temps chez un modèle animal mais par la suite dans une perspective clinique humaine.

3. Les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes humaines

Afin de nous placer dans les conditions d'utilisation finale des patchs en clinique, nous avons décidé de les ensemercer avec des cardiomyocytes humains. Actuellement une des seules possibilités d'obtenir un très grand nombre de ces cellules consiste à les dériver à partir de cellules souches pluripotentes humaines. Nous avons commencé à travailler sur des cellules embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) en collaboration avec le laboratoire du Pr. Jérôme Larghéro à l'hôpital Saint-Louis. Pour des raisons réglementaires et de simplicité nous avons choisi d'utiliser pour notre étude une lignée d'hiPSC disponible dans le commerce (Gibco® Human Episomal iPSC Line dérivée à partir de cellules CD34+ de sang de cordon).

C'est en 2007 que Yamanaka (Takahashi et al. 2007) a démontré qu'il était possible de reprogrammer des cellules adultes en cellules souches pluripotentes. Ainsi, les hiPSC sont très similaires aux cellules souches embryonnaires, mais elles sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules adultes différenciées. Des

centaines de lignées d’hiPSC ont été obtenues depuis cette date et de nombreux protocoles ont été développés pour permettre d’orienter la différenciation de ces cellules vers un type cellulaire d’intérêt. Très rapidement la différenciation vers le lignage cardiaque a été obtenue en laissant les cellules souches pluripotentes former des corps embryoides (Keller 1995). Cependant une autre stratégie consiste à utiliser une approche basée sur la différenciation de monocouches de cellules. Cette approche permet d’obtenir des grandes quantités de cellules de manière plus aisée et plus contrôlée. Ainsi, dès 2007, des protocoles permettant d’obtenir des cardiomyocytes à partir de cellules souches pluripotentes humaines ont été publiés (Laflamme et al. 2007). Nous avons, pour notre part, choisi d’utiliser le protocole publié par l’équipe de Palecek (Lian et al. 2012) qui est basé sur la modulation temporelle de la voie Wnt. Ce protocole a ensuite été amélioré et simplifié successivement très récemment (Cao et al. 2013 ; Burridge et al. 2014) (*Figure 30*). Tous ces protocoles ont l’avantage d’utiliser des milieux chimiquement définis et sont ainsi susceptibles d’être aisément transposés pour une utilisation clinique. Ils sont également très efficaces et, dans nos mains, nous permettent d’obtenir une population de cellules constituées à environ 80% de cellules positives pour le marqueur cardiaque Troponine T.

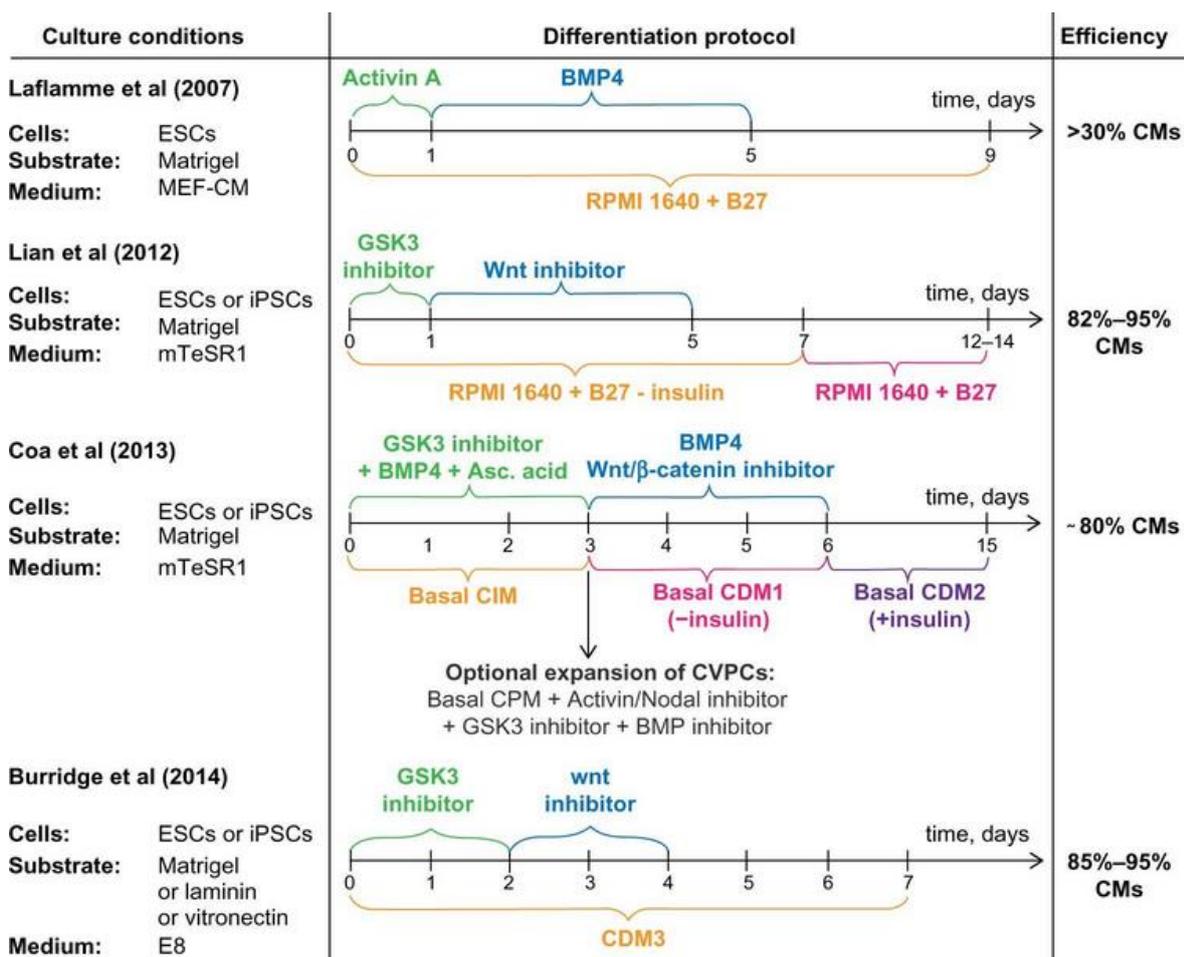


Figure 30 : Chronologie des méthodes de différenciation cardiaque basées sur des monocouches de cellules souches pluripotentes humaines. Figure issue de (Batalov et Feinberg 2015).

4. Le projet CardiacPatch

Le projet CardiacPatch (financé par l'ANR) dans lequel je me suis impliquée au cours de ma thèse consiste donc à associer les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS-CM) à une matrice de collagène électrospinnée. Ces matrices pourraient permettre d'améliorer la survie des hiPS-CM greffées sous forme de microtissus cellularisés et vascularisés, et également de fournir un support souple capable de suivre la contraction induite par les cellules d'intérêt. Une fois obtenue, ces matrices ont été implantées sur l'épicaarde d'un modèle souris de cardiomyopathie dilatée pour en étudier les effets.

Dans un premier temps, une étude de la faisabilité de l'obtention de matrices nanofibreuses de collagène avec des solvants biocompatibles et des agents pontants (ou cross-linkers) a été réalisée pour sélectionner les meilleures conditions d'obtention des matrices de collagène (pourcentage d'acide citrique : 5 ou 10%, et différents temps de cuisson à 150°C : 90, 120, ou 150 minutes). Suite à ces données, un premier article a été publié : Kitsara, M.*, Joanne, P.*, Boitard, S.E., Ben Dhiab, I., Poinard, B., Menasché, P., Gagnieu, C., Forest, P., Agbulut, O., and Chen, Y. (2015). Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers. *Microelectron. Eng.* 144, 46–50. **This authors contributed equally.*

Dans un second temps, la biocompatibilité de ces matrices a été étudiée tout d'abord *in vivo* en implantant les matrices chez des souris saines C57Bl6 pour analyser la maniabilité du support de collagène, un potentiel rejet immunitaire et la vascularisation potentielles de ces patchs. Puis des tests *in vitro* de culture de cardiomyocytes de rat nouveaux nés nous ont permis d'évaluer le taux de survie des cellules sur les matrices.

Dans un troisième temps, les matrices ont étéensemencées avec les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaine (hiPS-CM) puis greffées chez les souris α MHC-MerCreMer:Sf/Sf -modèle souris de cardiomyopathie dilatée basé sur une invalidation conditionnelle du gène Serum-Response-Factor (SRF), induite par le Tamoxifène, spécifiquement dans les cardiomyocytes. La faisabilité des patchs de collagène pour la greffe des cellules, ainsi que l'effet sur la fonction cardiaque et sur un potentiel remodelage ont été déterminés.

L'ensemble de ces données a fait l'objet d'un second article :

Joanne, P.*, Kitsara, M.*, Boitard, S.-E.*, Naemetalla, H., Vanneaux, V., Pernot, M., Larghero, J., Forest, P., Chen, Y., Menasché, P., et al. (2016). Nanofibrous clinical-grade collagen scaffolds seeded with human cardiomyocytes induces cardiac remodeling in dilated cardiomyopathy. *Biomaterials* 80, 157–168. **This authors contributed equally.*

Les différentes étapes de ce projet sont résumées dans la *Figure 31* :

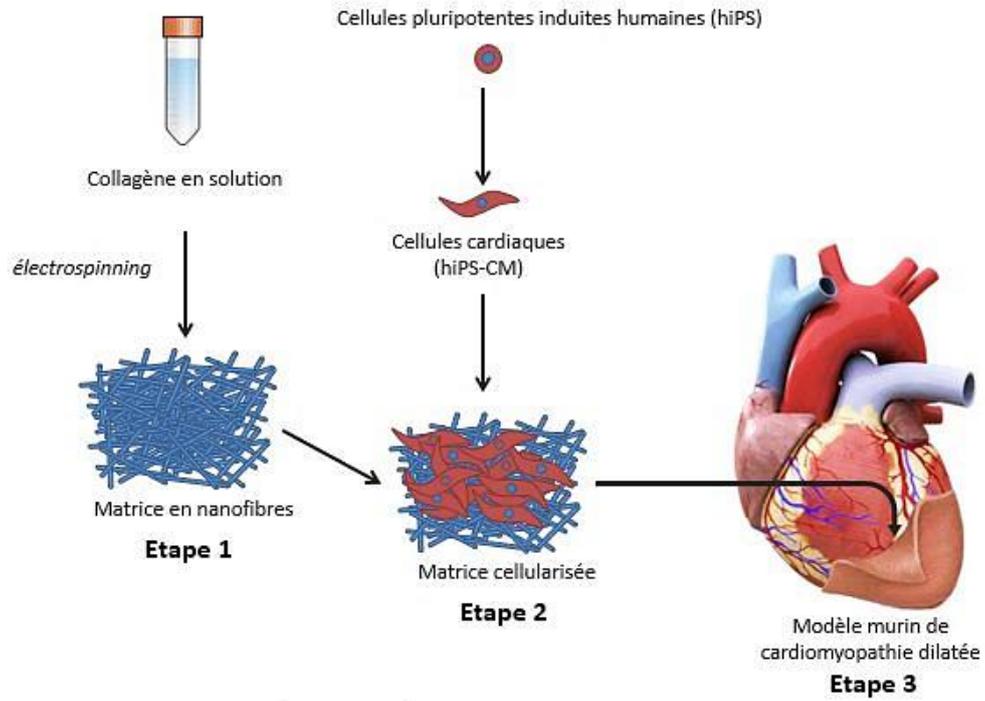


Figure 31 : Différentes étapes du projet d'étude des patchs en nanofibres de collagène.

Méthodologie détaillée

1. Obtention des patches en nanofibres de collagène

a) Mise au point des conditions d'électrospinning du collagène

La mise au point, l'obtention et la caractérisation des matrices de collagène ont été effectuées en collaboration avec le Dr. Maria Kitsara à l'Ecole Normale Supérieure au sein de l'équipe du Dr. Yong Chen. Pour obtenir une matrice en 3D formée de nanofibres de collagène, nous avons utilisé la technique de l'électrospinning. Pour cela, le collagène est mis en solution dans un mélange de solvants non-toxiques, de sel, d'éthanol. Pour le pontage des matrices, de l'acide citrique (CA), du glycérol et du sodium hypophosphite sont ajoutés à la solution de collagène. Après dissolution du mélange pendant plusieurs heures, il est placé dans une seringue puis propulsé dans un champ électrique pour former des nanofibres (*Figure 32*). Ces nanofibres sont ensuite récupérées sur un collecteur plat en aluminium et chauffées pendant un temps donné à 150°C pour ponter les nanofibres et ainsi obtenir une matrice stable. Le patch est ensuite stérilisé dans l'éthanol et après plusieurs rinçages au PBS, il est placé dans un support pour être utilisé en culture cellulaire.

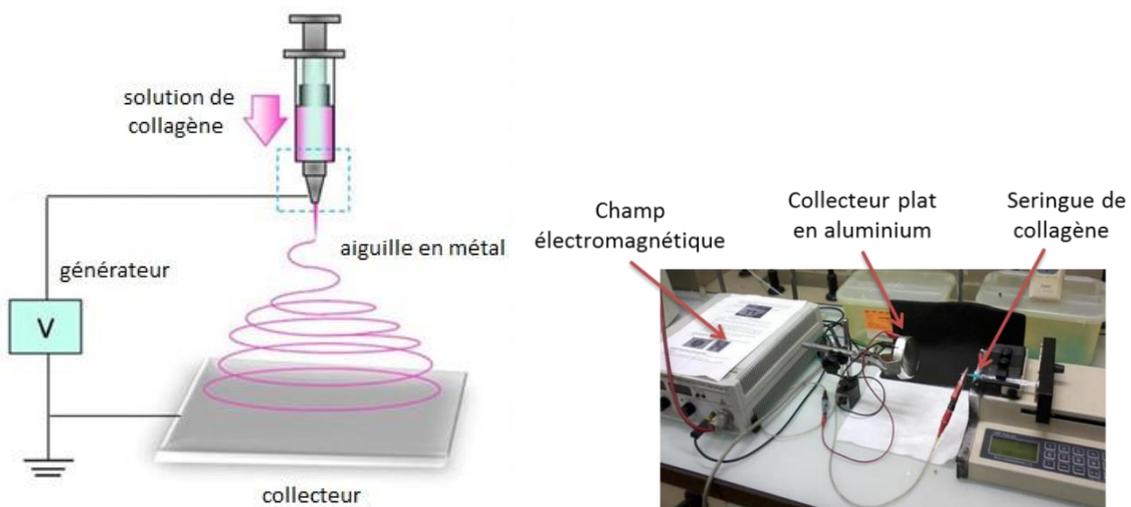


Figure 32 : Principe de l'électrospinning et présentation du montage technique pour l'obtention des matrices de collagène.

De manière plus détaillée, l'atélocollagène, après lyophilisation, a été dissout avec un solvant biocompatible composé d'éthanol et de PBS20x au ratio 1 :1 (v/v) afin de maintenir un niveau élevé de conductivité apportée par les sels et de solubiliser correctement le collagène. La solution tampon contient 54 mM de chlorure de potassium, 2,75M de chlorure de sodium, 30 mM de phosphate de potassium monobasique et 162 mM de phosphate de sodium dibasique heptahydrate. Ces sels sont dilués dans de l'eau distillée et tamponnée à pH 7,4. La concentration de la solution de collagène avant électrospinning est de 16% pour un volume final de 2 mL. La solution de collagène est placée sous agitation magnétique pendant 4 à 5 heures pour dissolution complète.

Pour le pontage des nanofibres de collagène (ou cross-linking), différents systèmes ont été envisagés et testés dont :

- 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide et N-hydroxysuccinimide : le plus couramment utilisé dans la littérature après l'utilisation du glutaraldéhyde
- Glycogène oxydé : méthode utilisée par L'entreprise Biom'Up
- Acide citrique avec glycérol + chauffe à 150°C : facilité de manipulation et non toxique
- Vapeurs d'hydroxyde d'ammonium : meilleur maintien de la structure 3D des matériaux

Afin de travailler avec des produits non toxiques et utilisable en culture cellulaire, nous avons choisi de travailler avec l'acide citrique (CA) pour le pontage, le glycérol en tant qu'agent extenseur de fibres, et le sodium hypophosphite comme catalyseur (Jiang et al. 2013). Différentes concentrations de CA et de sodium hypophosphite (SHP) ont été testées : 5% CA avec 2.5% SHP et 10% CA avec 5% SHP (pourcentage basé sur la masse de collagène).

Différents paramètres d'électrospinning ont été évalués :

- Aiguille : 23 Gauge
- Différentes distances entre le collecteur et la seringue (7 et 5 cm)
- Différents flux : 0,5 ml/h, 1 ml/h et 1,5 ml/h
- Temps d'électrospinning : 8 minutes

Les résultats ont montré que les meilleures conditions d'électrospinning sont les suivantes : voltage de 13,5 Kv, distance entre la seringue et le collecteur de 5 cm, flux de 1 ml/h, avec une température de : 20±2°C.

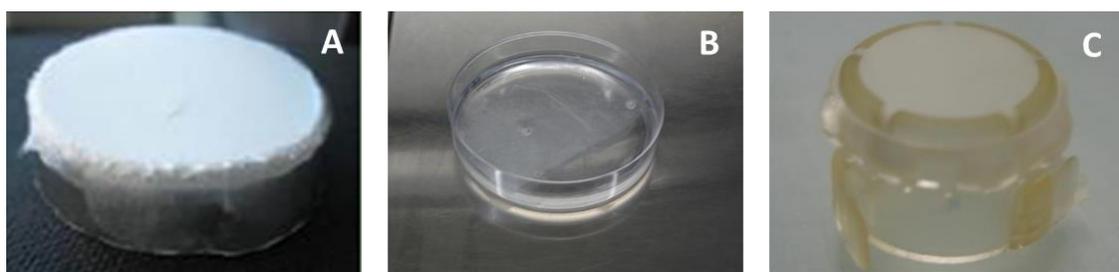


Figure 33 : Observation des matrices de collagène à différentes étapes du protocole : A) patch présent sur le collecteur plat en aluminium après l'électrospinning, B) patch hydraté après l'étape de pontage, C) patch maintenu dans les boîtes de culture grâce au Cell Crown®.

Après l'électrospinning, le pontage des patches est réalisé en chauffant les patches à 150°C pendant différents temps dans un four sec. Trois temps de chauffe ont été testés : 90, 120 et 150 minutes. Après l'insertion des patches dans le Cell Crown® (Figure 33), sa taille est de l'ordre de 1cm de diamètre.

Résumé des étapes d'obtention des matrices de collagène :

- Atellocollagène de type I et III

- Solvant de solubilisation du collagène : PBS avec éthanol
- Pontage 1 : acide citrique (CA) 5 ou 10%
- Paramètres d'électrospinning : voltage 13,5 Kv ; débit 1 mL/h ; distance aiguille-collecteur 5 à 10 cm
- Pontage 2 : chauffe à 150°C pendant 90, 120 ou 150 minutes
- Stérilisation des patches : éthanol 70%
- Placement des patches dans le Cell Crown® pour les maintenir au fond des puits de culture cellulaire
- Hydratation des patches dans du PBS puis du milieu de culture avant l'ensemencement des cellules.

b) Obtention des patches en nanofibres alignées

Afin de faire évoluer les matrices en collagène, de nouveaux patches ont été réalisés au sein de l'équipe du Pr. Guy Schlatter à l'Institut de Chimie et Procédés pour l'Énergie, l'Environnement et la Santé à Strasbourg. Pour cela, une chambre à électrospinning a été utilisée ainsi qu'un collecteur rotatif (de 5 cm de diamètre) permettant d'obtenir des nanofibres alignées. Les paramètres de préparation des patches décrits précédemment ont été conservés (16 % de collagène, dissolution dans un mélange PBS/éthanol, pontage des matrices avec acide citrique et chauffe à 150°C). Cependant, l'utilisation d'une chambre pour l'électrospinning a permis de définir précisément les paramètres de température et d'hygrométrie. Le procédé mis en place est représenté sur dessous (*Figure 34*) :

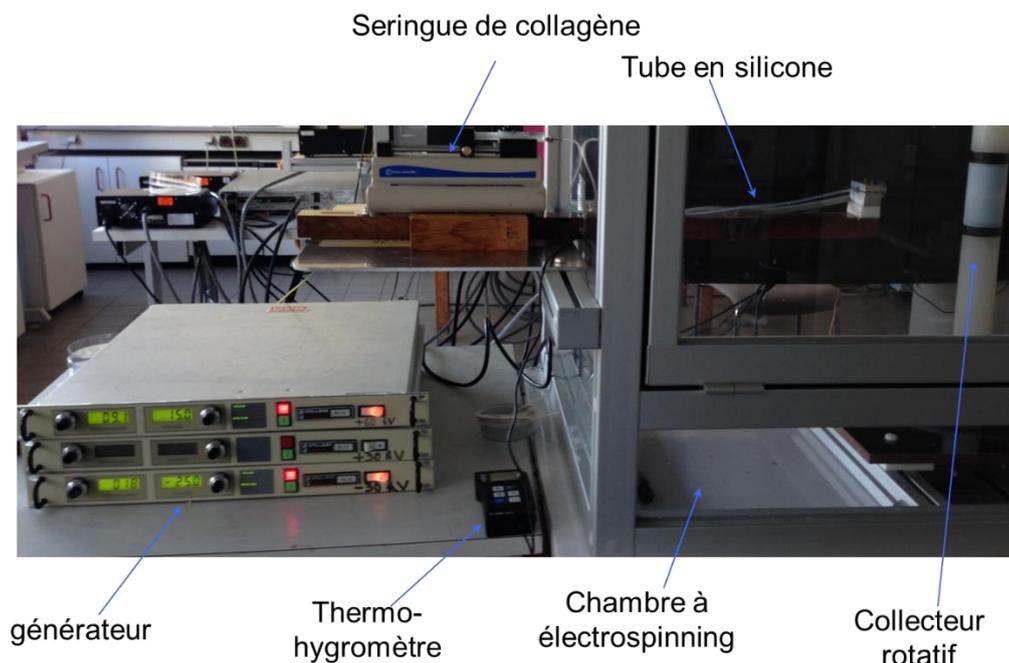


Figure 34 : Présentation du montage technique pour l'obtention des matrices en nanofibres de collagène alignées.

Les paramètres liés à l'obtention des matrices alignées ont été défini comme tels:

- Vitesse de rotation : 1215 tours par minute
- Temps d'électrospinning : 5 minutes
- Débit : 0,4 mL par heure
- Distance aiguille/collecteur : 18/16 cm
- Température et hygrométrie : 24,1°C avec 46,4% d'humidité.

c) Préparation des hydrogels de fibrine

Les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS-CM) sont récupérés après 15 jours de culture et 1 million de cellules sont repris dans 150 μ L de RPMI + fibrinogène (20 mg/mL) dans une boîte de culture recouverte d'une fine couche d'agarose pour éviter l'adhérence de la fibrine. Puis, 150 μ L d'une solution de thrombine (4U) est ajoutée et mélangée à la solution de fibrine. La thrombine va alors cliver le fibrinogène en fibrine. Les protéines de fibrine s'organisent naturellement en réseau pour former un hydrogel. Ce processus est similaire à celui de la formation d'un caillot pour la coagulation sanguine. La polymérisation est effectuée à 37°C pendant 30 minutes. Le fibrinogène et la thrombine sont des composants du kit EVICEL (Ethicon Biosurgery, Omrix Biopharmaceuticals, Saint Genèse, Belgique).

d) Obtention des images par microscopie électronique à balayage (SEM)

Les mesures de SEM ont été effectuées à l'aide de e-LiNE (Raith, Dortmund, Allemagne). Une fine couche d'or de 5 nm a été déposée sur les patchs secs, avant les mesures, et les images ont été obtenues à différents grossissements dans au moins trois régions différentes du même échantillon. Cinq échantillons différents ont été mesurés dans des conditions similaires. Les mesures ont été effectuées sous extra haute tension de l'ordre de 10kV. L'analyse des images SEM a été effectuée à l'aide du logiciel Fiji. Les valeurs d'épaisseur des fibres de collagène ainsi que de la porosité sont dérivées de la conversion binaire des images (traitement de l'image en noir et blanc). Pour l'évaluation de l'épaisseur de chaque fibre et de la porosité des matrices, les images au grossissement 1000X ont été prises afin de couvrir une grande zone (jusqu'à 100 μ m \times 100 μ m) et obtenir des valeurs plus représentatives.

e) Mesure d'élasticité (module de Young)

L'élastographie par onde de cisaillement (ShearWave™) est un mode d'imagerie par ultrason, en temps réel, permettant la mesure quantitative de l'élasticité des tissus « mous » (Pernot et al. 2011). Cette mesure est effectuée à l'aide d'un échographe ultrarapide qui permet de créer une cartographie quantitative du module de Young. Il est alors possible de quantifier de manière précise les changements importants d'élasticité locaux du biomatériau. Ces mesures ont été faites à l'Institut Langevin (UPMC, France) sur la plateforme d'Imagerie Fonctionnelle Ultrasonore en collaboration avec le Dr. Mathieu Pernot.

Pour cela, les logiciels Supersonic Imagine AixPlover® et UltraFast™ Imaging ont été utilisés. Le principe de l'élastographie ShearWave™ repose sur l'imagerie à très haute fréquence (5000 images par seconde) de la propagation à distance d'une onde de cisaillement induite par la force de rayonnement acoustique. La carte de module de cisaillement est alors directement dérivée de la vitesse de cisaillement locale mesurée dans l'échantillon. Un transducteur à ultrasons (ayant une fréquence centrale de 15 MHz) connecté à un scanner à ultrason AixPlover® (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) a été utilisé. L'imagerie B mode en temps réel a été utilisée pour mesurer l'épaisseur des échantillons. La vitesse de propagation des ondes de cisaillement a été calculée à partir des matrices de collagène dans une solution aqueuse.

Les élastographies par onde de cisaillement en temps réel sont représentées sous forme d'une carte de plages colorées ce qui permet d'évaluer quantitativement la rigidité du biomatériau. Une correction a été appliquée sur la vitesse de cisaillement pour tenir compte de l'effet de l'onde guidée lié à la paroi mince (Couade et al. 2010) et enfin obtenir des valeurs quantitatives du module de Young.

f) Spectroscopie par dichroïsme circulaire

Les spectres obtenus par dichroïsme circulaire (DC) permettent d'étudier le repliement d'une protéine de manière très rapide. Nous l'avons utilisée pour étudier la conformation du collagène en solution, avant et après électrospinning, afin de savoir si le collagène a été dénaturé ou non après la préparation de la solution de collagène et après l'électrospinning. En effet, quand le collagène est dénaturé, il devient de la gélatine (Bozec et Odlyha 2011) ce qui peut modifier les caractéristiques des patches. C'est pourquoi il est important de vérifier l'état de dénaturation du collagène. La solution de collagène à 16%, étant trop concentrée pour obtenir des spectres lisibles, a été diluée à 1 mg/mL. Une solution contrôle à 1% de collagène a également été testée. Un patch de collagène a été réalisé puis réhydraté et mis en solution avec le mélange éthanol et sels pour obtenir la solution de collagène électrospinnée. La solution de collagène dénaturé a été obtenue en chauffant le collagène à 90°C pour obtenir une dénaturation totale.

Pour entrer dans les détails, les spectres de dichroïsme circulaire (DC) ont été enregistrés avec un spectropolarimètre J-810 lié à un système Peltier (PTC-423S/15) provenant de Jasco Analytica Instruments (Bougenais, France). Les spectres ont été balayés entre 260 et 190 nm avec une amplitude de 0,5 nm de hauteur et une vitesse de balayage de 50 nm/min. Les échantillons ont été analysés 10 fois et une moyenne de tous les spectres par rapport au blanc (référence) pour chaque échantillon a été effectuée.

Les concentrations finales de tous les échantillons de DC ont été ajustées à 1 % p/v. La concentration de collagène dans les solutions a été vérifiée à partir de la valeur

d'absorption de chaque échantillon mesuré à 192 nm pour s'assurer que la concentration était bien identique pour tous les échantillons.

Les spectres des DC ont été recueillis à l'aide des cuves de quartz ayant une longueur de trajet optique de 0,01 mm. Etant donné que le collagène a été dilué dans une solution contenant un mélange d'éthanol et de sels, le spectre de référence de la solution a été utilisé comme blanc pour tous les échantillons contenant du collagène. Le spectre du blanc a été soustrait au spectre moyen de chaque échantillon afin d'obtenir une courbe corrigée. Tous les spectres ont été enregistrés à 20° C.

Une estimation du spectre du collagène replié (structure normale du collagène) (Ackerman et al. 1999) a été utilisée pour l'extraction de la fraction de la triple hélice, s'appuyant principalement sur l'état d'équilibre des spectres de collagène. La fraction de collagène dénaturé (θ) a été définie comme telle :

$$\theta = (\theta_{\text{obs}} - \theta_u) / (\theta_t - \theta_u)$$

où θ_{obs} , θ_t et θ_u représentant l'ellipticité observée, en triple hélice et en état non ordonnée, respectivement mesurée à une longueur d'onde de 221,5 nm.

θ_t et θ_u ont été mesurés à 20° C et 90° C. Le pic de PP-II à 221,5 nm correspond aux ellipticités positives à 20° C et bascule aux ellipticités négatives à 90° C, ce qui indique que le collagène est entièrement dénaturé à cette température.

g) Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact (en position statique) consiste à placer une goutte d'eau sur la surface de l'échantillon à tester. L'angle formé à la limite de la goutte et du support est l'angle de contact et permet de caractériser la surface du biomatériau : la perméabilité de celui-ci ainsi que sa capacité d'absorption (Lamour et al. 2010). Plus l'angle est élevé, plus la surface est hydrophobe moins elle va adhérer (sur une surface humide), plus il est difficile de l'humidifier et plus l'énergie libre de surface solide sera faible (*Figure 35*). A l'inverse, plus l'angle est faible et plus la surface est hydrophile avec une bonne adhérence sur une surface humide, une bonne capacité d'hydratation et une haute énergie libre de surface solide.

Pour effectuer les mesures, les patches de collagène ont été immergés dans l'eau puis placés dans les Cell Crown® (Scaffdex, Finlande). Différentes mesures ont été effectuées sur les patches de collagène : patch non-ponté, et patch ponté 5 secondes et 60 secondes après le dépôt de la goutte.

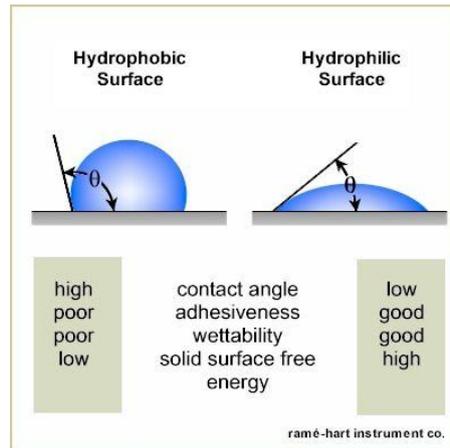


Figure 35 : Présentation du principe de mesure de l'angle de contact entre un liquide et la surface d'un support

2. Culture cellulaire

a) Isolation des cardiomyocytes de rats nouveaux nés

Des cardiomyocytes de rats-nouveaux nés ont été obtenus à partir de rats nouveaux nés âgés d'un jour Wistar RjHan (Janvier Labs, Saint-Berthevin, France). Une fois que les ventricules ont été isolés, ils sont lavés dans une solution de Tyrode, coupés en petits morceaux et digérés avec de la liberase™ (Roche Diagnostics, Meylan, France) dans une solution de Tyrode oxygénée. Après cette étape de digestion enzymatique, les cellules ont été resuspendues et conservées dans un milieu RCM à 37° C sous 1 % de CO₂ (composition du milieu pour cardiomyocytes issus de nouveaux-nés : DMEM sans sodium pyruvate, sérum de veau fœtal 5 %, 10 % de sérum de cheval, 1 % pénicilline/streptomycine). Les cellules ont été ensuite purifiées sur un gradient de Percoll (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) puis remises en suspension dans un milieu pour cardiomyocytes jusqu'à leur utilisation. Deux cent mille cellules ont étéensemencées sur les matrices de collagène et maintenues en culture grâce au Cell Crown® (Scaffdex, Finlande) dans une plaque de 24 puits et après trois jours de culture, les cellules ont été fixées et immunomarquées avec les anticorps anti-Nkx2.5 (Santa Cruz Biotechnology, Allemagne) et anti- α -actinine (Sigma-Aldrich, France) pour déterminer le pourcentage de cardiomyocytes présents sur les matrices.

b) Culture des cardiomyoblastes H9C2

La lignée de H9C2 provient de cœur de rat embryonnaire. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (haut taux de glucose + supplément Glutamax) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont étéensemencées sur le collagène après un traitement à la trypsine-EDTA. Après deux jours de culture, les patchs sont lavés avec du PBS et fixés avec 1% de paraformaldéhyde. Après deux lavages, les patchs sont incubés avec 5% d'albumine du sérum bovin (BSA) pendant 1 heure. La phalloïdine Alexa Fluor®488 (Life technologies) a été utilisée pour marquer les cellules. Après trois lavages au PBS, les

patches de collagène ont été placés sur une lame et montés avec du mowiol. Les images ont été obtenues avec un microscope confocal motorisé (LSM 700, Zeiss).

c) Amplification des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS)

La lignée cellulaire d'iPS humaine (hiPS, Life Technologies, France) a été utilisée dans cette étude du 4^{ème} au 10^{ème} passage et cultivée au départ sur vitronectine avec un milieu Essential 8TM (Life Technologies, Saint-Aubin, France) puis transférée sur Matrigel® - matrice qualifiée pour les hESC (Corning Life Sciences, Amsterdam, Pays-Bas) dans le milieu mTeSR^{TM1} (Stemcell Technologies, Grenoble, France). L'ensemble des expériences de culture des hiPS et de différenciation et caractérisation ont été réalisés par le Dr. Pierre Joanne au sein de l'équipe du Pr. Agbulut. Après quelques passages en utilisant du VerseneTM (Life Technologies), la lignée cellulaire a été congelée dans un milieu de congélation pour conservation (90% mTeSR^{TM1} et 10% diméthyl sulfoxyde).

d) Différenciation cardiaque des hiPS-CM

Pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour la différenciation, un cryotube de cellules hiPS a été décongelé et amplifié sur deux passages sur Matrigel® - matrice qualifiée pour les hESC (Corning Life Sciences, Pays-Bas), dans du milieu mTeSR^{TM1} (Stemcell Technologies, France) (*Figure 36*). Les cellules ont ensuite été différenciées en utilisant le protocole GiWi (Lian et al. 2012) à 37°C avec 5% de CO₂. Ainsi, après amplification, les cellules sont détachées avec de l'acutase (StemPro®-Accutase® Cell Dissociation Reagent ; Life Technologies, France) puis comptées. Les cellules non-différenciées sont ensuiteensemencées sur Matrigel® pour tapisser les puits d'une plaque 12 puits (1.10⁶ cellules par puits) dans du milieu mTeSR^{TM1} supplémenté avec 5 µM de Y27632 (inhibiteur de ROCK, Tocris Bioscience, Royaume-Uni) et cultivées pendant trois autres jours avec un changement quotidien de mTeSR^{TM1}. La différenciation cardiaque a été initiée en remplaçant le milieu par du milieu RPMI (Life Technologies, France) enrichi avec 2% de supplément B27 sans insuline (Life Technologies, France) et 10 µM de CHIR99021 (Selleckchem, Allemagne). Ce milieu est remplacé avec du RPMI supplémenté avec B27 sans insuline après 24 heures. Deux jours après, le milieu est remplacé pour moitié avec du milieu RPMI-B27 sans insuline frais contenant 5 µM d'IWP2 (Tocris Bioscience, Royaume-Uni) pendant 48 heures. Sept jours après l'addition de CHIR99021, le milieu est remplacé par du RPMI enrichi avec 2% de supplément B27. Les tout premiers clusters de cellules battantes sont observables les jours suivants (à partir du 8^{ème} jour). Les précédentes données nous ont permis de montrer que le battement des cellules en monocouche est optimal entre J10 et J12. A partir de J15, les cellules sont récupérées avec de l'acutase, puis passées dans un tamis cellulaire de 70 µm (BD Biosciences, France) et enfin comptées. La pureté est confirmée par cytométrie. Pour l'ensemencement sur les patches, 10⁶ cellules sont déposées sur les matrices de collagène placées dans des Cell Crown® (Scaffdex, Finlande) dans des plaques 24-

puits avec du RPMI supplémenté avec 2% de B27. Après deux jours, le milieu est changé et un jour après, les patchs sont enlevés et greffés sur les cœurs de souris.

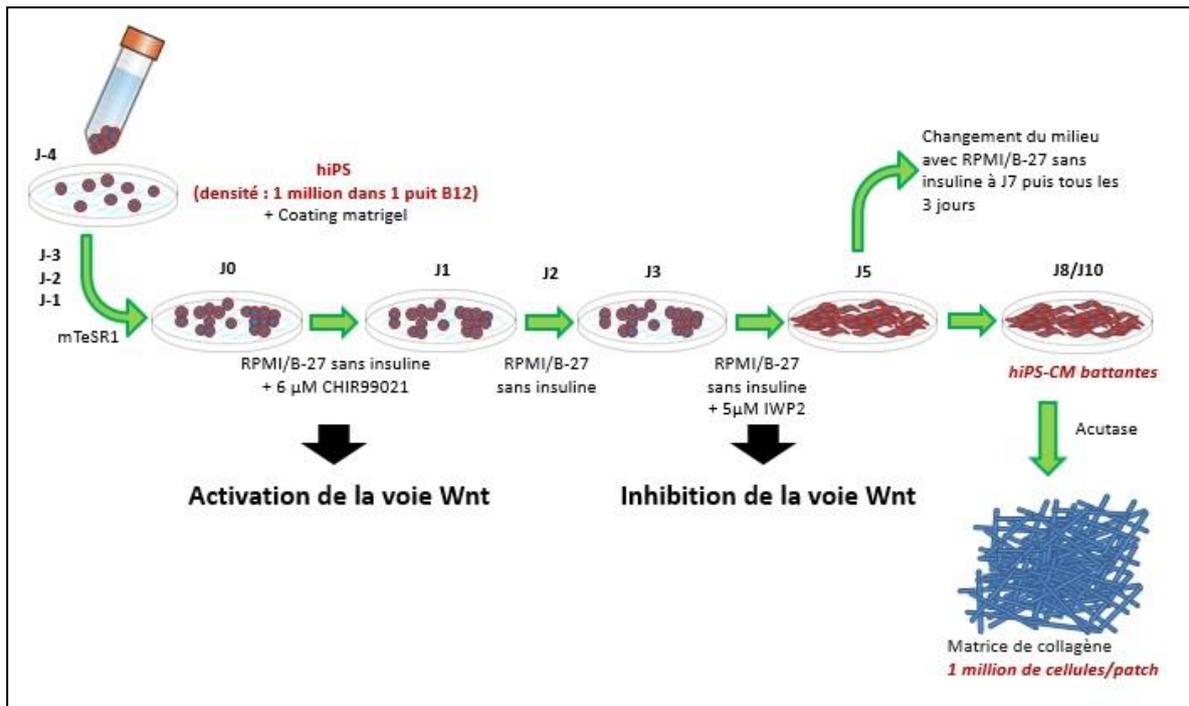


Figure 36 : Schématisation du protocole de différenciation des cellules pluripotentes humaines en cardiomyocytes basé sur une activation puis une inhibition de la voie Wnt. (Lian et al. 2012).

e) Cytométrie

Toutes les analyses ont été effectuées avec un analyseur MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec, Paris, France) sur la plate-forme d'imagerie Paris Seine (UPMC-IBPS, France) avec l'aide de Annie Munier. Les cellules différenciées battantes ont été récupérées 15 jours après le début du protocole de différenciation cardiaque (Figure 36). L'analyse de la pluripotence a été réalisée avec le kit d'analyse des facteurs de transcription pour les cellules souches humaines pluripotentes (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) suivant les instructions du fabricant. Pour l'évaluation de l'efficacité de la différenciation cardiaque, les cellules sont incubées à 37 °C en présence de 0,05 % de trypsine-EDTA (Life Technologies). La réaction est stoppée avec du sérum de veau fœtal 20 % et les cellules sont délicatement prélevées et passées à travers un tamis cellulaire de 40 µm (BD Biosciences) pour supprimer des agrégats cellulaires. Les cellules sont ensuite comptées, lavées avec du PBS, et fixées avec du paraformaldéhyde à 1 % pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont de nouveau rincées avec du PBS et perméabilisées avec du méthanol froid (10 minutes à 4° C). Après plusieurs lavages, les cellules sont immunomarquées pendant 1 heure avec un anticorps primaire tel que décrit dans le kit de marquage Zenon® Allophycocyanine souris IgG1 (Life Technologies). Les cellules sont lavées 2 fois et ensuite analysées. Les anticorps utilisés pour l'analyse de la différenciation cardiaque sont : anti-troponine T (souris monoclonal IgG1, dilution 1 :50 ; Thermo Fisher Scientific) et un isotype de contrôle souris IgG1-APC (Miltenyi Biotec).

3. Animaux

Toutes les procédures expérimentales liées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel ainsi que le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche en respectant la législation Européenne (Directive 2010/63/EU) sur le bien-être animal. Le numéro éthique attribué au projet, par le comité d'éthique Charles Darwin, est #4370. Dans cette étude, un total de 56 animaux a été utilisé avec des souris invalidées conditionnellement pour le gène Serum Response Factor (SRF) âgées de 6 à 9 mois, (α MHC-MerCreMer:Sf/Sf)(26) (n=32) ou des souris C57Bl6 (n=24) en tant que receveuses. L'excision, médiée par l'enzyme Cre, des allèles floxés du gène SRF dans le cœur a été induite par des injections intrapéritonéales de tamoxifène (20 μ g/g/j ; Sigma-Aldrich, France) réparties sur trois jours. Les souris sont ensuite greffées trois semaines après la dernière injection de tamoxifène. L'ensemble des expérimentations animales ont été réalisées sur la plateforme de microchirurgie du petit animal au Centre de Recherche Cardiovasculaire de Paris au sein de l'équipe du Pr. Philippe Menasché. Les analyses échocardiographiques ont été supervisées par le Dr. Hany Naemetalla, cardiologue à l'hôpital Européen Georges Pompidou.

a) Obtention du modèle non-ischémique d'insuffisance cardiaque

Le modèle murin de cardiomyopathie dilatée α MHCMerCreSfSf, a été obtenu en 2005 par l'équipe du Dr. Zhenlin Li (Parlakian et al. 2005) en inhibant le gène Serum Response Factor (SRF). Le gène SRF est un facteur de transcription de la famille des MADS-box essentiel pour la différenciation et la maturation cardiaque (Arsenian et al. 1998). Le gène SRF contrôle l'expression des gènes du système contractile des cardiomyocytes. Il intervient également dans la formation précoce du cœur, c'est pourquoi l'inhibition de ce gène chez l'embryon est létale. L'invalidation doit se faire chez la souris adulte Black 6 de manière conditionnelle. Le mécanisme repose sur un système Cre/Lox. Deux types de souris génétiquement modifiées sont obtenues. La première souris (souris SfSf) possède l'exon 2 du gène SRF encadré de séquences Lox-P. La deuxième souris (souris α MHCMerCre) possède le gène de l'enzyme Cre recombinase sous contrôle du promoteur α -MHC et encadré par des séquences codantes pour le récepteur membranaire des œstrogènes (Mer). L'isoforme α -MHC est exprimée spécifiquement dans les cardiomyocytes. Le gène SRF sera donc invalidé uniquement dans les cardiomyocytes de souris issues du croisement de ces 2 types de souris.

Cependant, à la naissance, les souris issues du croisement (souris α MHCMerCre) ne sont pas malades. L'injection de tamoxifène entraîne la modification des protéines hsp70 ainsi que la libération des récepteurs Mer, qui étaient au niveau de la membrane plasmique, et active la migration nucléaire de toute la construction. L'enzyme Cre se retrouve alors dans le noyau. Il y a alors excision de l'exon 2 au niveau des séquences Lox-P par l'enzyme Cre et ainsi inhibition de la synthèse de

SRF dans les cardiomyocytes. L'inhibition du gène SRF induit la diminution de l'expression des protéines de structure du cardiomyocyte comme l'actine et la myosine, l'apoptose des cellules cardiaques et le développement de fibrose. La maladie est homogène et très évolutive. La fraction d'éjection commence à diminuer de manière significative dès les premiers jours suivant l'injection de tamoxifène. En parallèle, le diamètre diastolique du ventricule gauche augmente. Sans traitement, les souris meurent 8 semaines après l'injection de tamoxifène. Le déroulement des manipulations s'est fait selon le protocole suivant : à J0, la cardiomyopathie dilatée est induite chez des souris âgées de deux mois par injection de tamoxifène à 20mg/kg/jour (aiguille 25Gx5/8 de 1mL) en intrapéritonéale (ou IP) pendant 3 jours. Le cœur commence à se dilater et la fonction systolique à s'altérer 21 jours après l'injection. C'est à ce moment-là qu'une analyse échocardiographique est effectuée suivie de l'implantation des biomatériaux.

b) Génotypage des animaux

Une vérification du génotype des souris α MHC^{MerCre} est nécessaire avant d'inclure les animaux dans l'étude. Le génotypage a été effectué à l'aide du kit KAPA Mouse Genotyping (KAPA BIOSYSTEMS, Massachusetts, USA) à partir d'un prélèvement de queue de souris d'environ 2 mm³ selon les recommandations du fabricant. Les prélèvements tissulaires sont dans un premier temps lysés avec l'enzyme de lyse (1 U/ μ l KAPA Express Extract Enzyme) puis l'ADN extrait est mis en présence des amorces pour vérifier la présence de la construction (*Tableau 5*) et amplifié selon le programme de PCR suivant : 3 min à 95°C, 35 cycles de (15 sec à 95°C, 15 sec à 60°C, 25 sec à 72°C), 7 min à 72°C puis maintien à 10°C. L'ADN amplifié est ensuite déposé sur un gel d'agarose 2% en présence de GelRedTM, un intercalant de l'ADN (Biotium, Hayward, USA). Un marqueur de taille est également déposé sur le gel (Gene ruler 1Kb DNA LadderTM, ThermoFisher, Villebon-sur-yvette, France). Après autoradiographie des gels (Figure 37), les bandes d'ADN amplifiées (ou non) sont révélées et permettent de sélectionner les souris selon le génotype désiré. Les animaux conservés dans la lignée sont les mâles Cre positif SF3/SF4 hétérozygote et les femelles Cre négative SF3/SF4 hétérozygote. Une fois que ces animaux auront 2 mois, ils recevront une injection de tamoxifène afin d'activer le système et déclencher la cardiomyopathie dilatée.

Séquences des amorces pour l'amplification des amplicons Cre et SRF floxé	
gCreF : 5'CTT CTG TCC GTT TGC CGG TCG TGG 3'	gCreR : 5'TTT GCA CGT TCA CCG GCA TCA ACG 3'
gSF3 : 5'CTG TAA GGG ATG GAA GCA AGA GGG 3'	gSF4 : 5' AGT GAG GTC CCT ACC ACA CTA GAA 3'

Tableau 5 : Liste des séquences des amorces utilisées pour le génotypage des souris CMD.

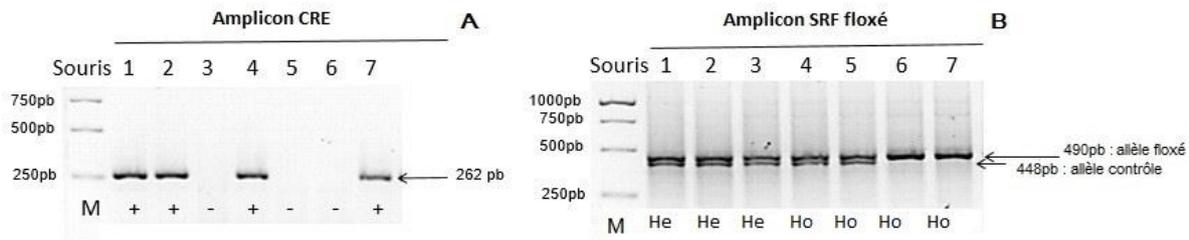


Figure 37 : Exemple d'autoradiographie obtenue après le génotypage des souris 1 à 7. A) Les signes + ou - indique la présence ou l'absence de la construction liée à l'enzyme Cre, B) Les initiales He correspondent au type Hétérozygote et Ho au type Homozygote. A et B) La lettre M correspond au dépôt du marqueur de taille 1kb. Dans cet exemple, seul l'animal 7 possède la construction Cre et les deux allèles floxés SRF. il sera conservé pour entretenir la lignée ou inclus dans les procédures expérimentales.

c) Greffe épocardique

Procédure générale : Les animaux sont pesés au préalable afin d'évaluer la quantité d'anesthésiant nécessaire. L'anesthésie générale de l'animal est effectuée par injection intra péritonéale d'une solution de kétamine associée à la xylazine dans les proportions suivantes (seringue de 29G de 0,5 ml) : kétamine : 100 mg/kg et xylazine (Rompun 2%) : 10 mg/kg. La vérification de la profondeur de l'anesthésie se fait par pincement des pattes. La partie abdominale est épilée là où l'incision sera faite, (tondeuse ou crème épilatoire) puis la peau est désinfectée à la bétadine. L'animal est maintenu sur une plaque chauffante (Minerve) à 37°C pendant toute la durée de la chirurgie. L'animal est intubé avec une canule souple reliée au respirateur (200 battements par min avec un volume d'air de 200 μ L) ; pression respiratoire : 17 à 18 cm H₂O. La peau est incisée entre le 3ème et le 4ème espace intercostal, les muscles sont disséqués puis la cage thoracique est maintenue écartée avec un écarteur. L'ouverture du sac péricardique est effectuée à l'aide d'une pince fine. Le cœur est séché avec une éponge fine puis le patch est suturé sur l'épicarde (2 points discontinus) avec du fil Prolene 8/0 (Ethicon, Norderstedt, Germany). L'espace intercostal est ensuite fermé à l'aide de 3 points de suture discontinus, puis 1 point discontinu pour les muscles et 5 points discontinus ou suture en surjet simple pour refermer la peau (fil prolene 6/0 (Ethicon, Norderstedt, Germany). Afin d'éviter la douleur, une injection de profénid (à 2mg/kg) en sous cutané est effectuée à proximité de l'incision. Si l'animal souffre, une réinjection de profénid est possible 12h et 24h après l'opération. Pour prévenir le dessèchement pupillaire, les yeux sont réhydratés avec quelques gouttes de sérum physiologique durant l'opération. L'animal est maintenu sur la plaque chauffante jusqu'au réveil puis désintubé au moment de son réveil. Celui-ci est ensuite placé dans une cage propre et est monitoré régulièrement sur 48h.

Obtention des groupes : Les patches de collagène sont suturés sur le ventricule gauche de 24 souris saines C57Bl6 et 26 souris atteintes de cardiomyopathie dilatée α MHCMerCreSfSf. Six souris α MHCMerCreSfSf (Sham) ont subis la même procédure mais sans l'implantation de patches. Les souris CMD ont reçu quotidiennement une

injection de ciclosporine A (10mg/kg/j ; Novartis, France) entre la première évaluation cardiaque (juste avant la greffe) et la deuxième - 14 jours après l'implantation. Les souris ont ensuite été sacrifiées par dislocation cervicale et après explantation du cœur, celui-ci est enrobé de Tissue-Tek (Sakura, USA) puis congelé dans de l'isopentane froid et dans de l'azote liquide. Des cryo-coupes de 10 µm sont ensuite réalisées pour les analyses histologiques et immunomarquages.

d) Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie

La fonction cardiaque pré et post-greffe a été évaluée par échocardiographie transthoracique à l'aide d'un appareil d'échographie Sequoia 516, équipé d'une sonde 13-15MHz (Sequoia 516, Siemens). Le principe de l'échocardiographie repose sur l'émission d'ultrasons par la sonde. Lorsque ces ultrasons rencontrent un obstacle physique (la paroi du cœur par exemple), elles sont réfléchies et captées de nouveau par la sonde puis analysées par l'appareil d'échographie. En fonction du temps entre l'émission et la réflexion des ultrasons, une distance est calculée et la cartographie du cœur est réalisée. Les structures cardiaques sont alors visualisées en fonction de la forme, la structure et de leurs contenus. Le logiciel de traitement des images est le logiciel Vevo ® 2100 VisualSonics. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (1 à 3%) dans une cuve à évaporation Minerve (équipement vétérinaire) avec un flux d'oxygène (de 1 L/min) puis placés sur une plaque thermorégulée à 37°C sous flux constant d'anesthésiant. A l'aide d'une sonde linéaire (15L8) à haute fréquence (15MHz), une visualisation générale du cœur en vue bidimensionnelle (ou B-Mode) et des coupes parasternales grand axe et petit axe en temps-mouvement (ou TM), permettant l'étude des mouvements des différentes structures cardiaques, les dimensions des cavités cardiaques et de l'épaisseur des parois, sont réalisées (*Figure 38*). Le diamètre télédiastolique (DTD), le diamètre télésystolique (DTS), l'épaisseur diastolique de la paroi postérieure (PPD) et l'épaisseur du septum interventriculaire en diastole (SVD) sont déterminés à partir des images échographiques enregistrées (sur au moins deux cycles cardiaques).

Le protocole en usage au laboratoire prévoit les acquisitions suivantes : Coupe 2D parasternale grand axe du ventricule gauche (incluant les valves mitrale et aortique et si possible l'apex) ; TM transventriculaire gauche à l'extrémité des feuillets mitraux en repérage 2D, curseur perpendiculaire au septum ; coupe 2D parasternale petit axe du ventricule gauche au niveau des piliers mitraux, en veillant à obtenir des contours endocardiques circulaires ; coupe 2D apicale 4 et 2 cavités cardiaques.

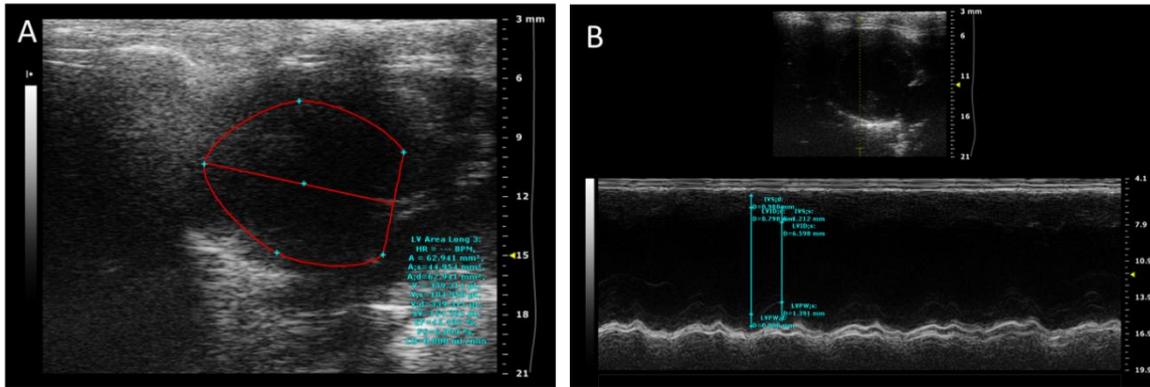


Figure 38 : Images type obtenues par échocardiographie transthoracique : A) Image en B-mode ; B) coupe transventriculaire ou TM.

Les mesures (et stockage) sont réalisées en mode « cineloop » et les valeurs retenues correspondent à la moyenne de 3 mesures. Les volumes ventriculaires sont calculés selon différentes formules (Teicholz (D3) ; ellipsoïde monoplan ($V=8D/3\pi L$) ; ellipsoïde biplan ($V=8A1A2/3\pi L$) ; Simpson monoplan ; Simpson biplan).

La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est calculée selon la formule :

FEVG (%) = [(VTD-VTS)/VTD] x 100 où VTD et VTS représentent les volumes télédiastolique ou télésystolique, respectivement. Les vues parasternales du petit-axe en deux dimensions ont été utilisées pour mesurer les volumes du ventricule gauche en fin de diastole et en fin de systole (respectivement LVEDV et LVESV).

Toutes les mesures ont été faites en triplicatas. La lecture des enregistrements a été faite en aveugle et validée par un échocardiographe expérimenté.

e) Immunomarquage et histologie

Immunomarquage sur cellules : Les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées avec 1% de paraformaldéhyde. Après deux lavages, elles ont été incubées avec du sérum bovin albuminé à 5% durant 1 heure, suivi par 90 minutes d'incubation à température ambiante avec les anticorps primaires (*Tableau 6*). Après trois lavages au PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire (Alexa 488 chèvre-anti-souris et Alexa 568 chèvre-anti-lapin, dilution 1 :1000 ; Life Technologies) et montées avec un milieu de montage contenant du mowiol et 5 µg/ml de Hoescht 33342 (Life Technologies). Les images ont été obtenues en utilisant un microscope confocal motorisé (LSM 700, Carl Zeiss, Marly le roi, France).

Anticorps	Référence	Dilution	Cible
α -actinine (sarcomérique)	Mouse – monoclonal, A7811 (Sigma-Aldrich)	1 : 300	Cellules cardiaques
Nkx2.5	Rabbit - polyclonal, sc 8697 (Santa Cruz)	1 : 50	Cellules du mésoderme cardiaque
Islet 1	Rabbit – monoclonal, ab109517, (Abcam)	1 : 250	
Ki67	Rat - monoclonal, clone TEC-3 (Dako)	1 : 100	Cellules en mitose
CD31	Rat - monoclonal, clone TLD-3A12 (AbD Serotec)	1 : 250	Cellules endothéliales
Cavéoline 1	Rabbit – polyclonal, sc894 (Santa Cruz)	1 : 50	
Lamine A/C	Mouse – monoclonal, ab8980 (Abcam)	1 : 200	Marqueur humaine (ubiquitaire)
Cytokératine 18	Mouse – monoclonal, ab55395 (Abcam)	1 : 25	
SRF	Rabbit – polyclonal, sc335 (Santa Cruz)	1 : 250	Cellules normales (non SRF Ko)

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés

Immunomarquage sur coupes congelées : Immédiatement après la dernière évaluation échographique et les sacrifices, les cœurs ont été prélevés et coupés en deux parties identiques de manière transversale. Les morceaux sont placés dans du Tissue-Tek (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) et congelés dans de l'isopentane froid puis dans de l'azote pour ensuite obtenir des coupes de 10 μ m d'épaisseur avec un cryostat (Leica Biosystems, ville, France). Les coupes congelées ont ensuite été fixées avec du paraformaldehyde 4%. Après deux lavages dans du PBS de 5 minutes chacun, les coupes sont plongées dans une solution froide de méthanol pendant 5 minutes. Après deux lavages dans du PBS, elles sont incubées avec 5% de BSA pendant 1 heure suivi d'une incubation de 90 minutes à température ambiante avec les anticorps dirigés contre SRF (IgG lapin, dilution 1 :250, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne) et CD31 (IgG rat, dilution 1 :150, AbD Serotec, Kidlington, Royaume-Uni). Après 3 lavages de 10 minutes chacun au PBS, les anticorps secondaires sont ensuite déposés sur les coupes (Alexa 568 chèvre-anti-lapin et Alexa 488 ou Alexa 568 chèvre-anti-rat, dilution 1 :1000 ; Life Technologies). Les coupes congelées sont ensuite lavées trois fois avec du PBS et montées avec du mowiol associé à du Hoescht 33342 à 5 μ g/ml (Life Technologies). Les images ont été capturées à partir d'un microscope inversé (Carl Zeiss). Pour l'évaluation histologique, les coupes ont été colorées avec l'hématoxyline/éosine afin d'analyser la structure du tissu cardiaque et le rouge sirius pour l'analyse du tissu fibreux qui remplace les cardiomyocytes manquant.

Activités des métalloprotéases (MMPs) : Il est possible d'évaluer l'activité des métalloprotéases par zymographie sur coupe tissulaire congelée. Pour cela, les lames fraîchement coupées sont incubées avec 30 μ g/mL de gélatine couplée à la fluorescéine (Molecular Probes G-13187) diluée dans un tampon d'activation des MMPs pendant 16 heures en chambre humide à 37°C dans l'obscurité. Les coupes sont ensuite incubées avec un marqueur des noyaux (DAPI) pendant 5 minutes, à l'obscurité. Après trois lavages au PBS, toujours à l'obscurité, les lames sont prêtes à être observées : la fluorescente verte (FITC) émise correspond à l'activité gélatinase.

En effet, quand les MMPs sont actives, elles vont dégrader la gélatine et ainsi libérer le marqueur fluorescent. Une quantification de la zone où les MMPs sont actives est possible avec Image J de la même manière que le protocole de quantification de la fibrose.

Coloration histologique hématoxyline-éosine : La coloration hématoxyline-éosine est une coloration histologique courante permettant l'analyse des tissus de l'échantillon ainsi que la présence et la forme des cellules. L'hématoxyline (CML-ID, Nemours, France) permet une coloration violette du noyau (colorant basique cationique) et l'éosine B 0,1% (CML-ID, Nemours, France) une coloration rose du cytoplasme (colorant acide anionique). Les coupes congelées de tissus sont fixées dans le formaldéhyde pendant 10 minutes, puis après plusieurs rinçages à l'eau du robinet et dans l'eau distillée, les lames sont plongées dans un bain d'hématoxyline. Suite à différents rinçages à l'eau pour éliminer le surplus de colorant, un bain d'éosine d'une minute suivi de plusieurs rinçages à l'eau pour éliminer tout le colorant en excès sont effectués. Après la déshydratation des lames par un bain d'éthanol absolu suivi de deux bains de xylène, le montage des lames est réalisé avec de l'Eukitt® (Freiburg, Allemagne). Après quelques heures de séchage, l'observation des lames et la prise de photographies sont obtenues avec un microscope optique (Leica, Nanterre, France) sous lumière blanche.

Coloration histologique Rouge Sirius : Cette méthode est basée sur la spécificité du colorant Rouge Sirius (CML-ID, Nemours, France) à 0,1% d'acide picrique, pour les fibres de collagène de type I et III. Les molécules du colorant s'alignent le long des fibres de collagène de par leur structure allongée. L'organisation sub-micrométrique du collagène détermine la concentration locale des molécules du colorant. Plus le rapport surface/volume du collagène est grand et plus la coloration sera intense. Le protocole de coloration consiste en une fixation des coupes pendant 10 minutes au formol 10% ; un rinçage à l'eau du robinet, une incubation dans le colorant pendant 60 minutes, un rinçage à l'eau du robinet suivi de deux rinçages à l'acide acétique 0,5% pour éliminer les surplus de colorant ; de 3 bains d'alcool (50%, 95% puis 100%) pour déshydrater les coupes, et de 2 bains de xylène. Le montage des lames est fait avec le baume d'inclusion Eukitt® qui a une forte affinité pour le xylène. L'observation des lames est possible après plusieurs heures de séchage sous la hotte. Les fibres de collagène apparaissent rouges sur fond jaune pâle. Par cette coloration, il est possible d'identifier les zones de fibrose, là où le tissu cardiaque est endommagé. Six images (trois à proximité et trois éloignées du patch) sont réalisées avec un microscope optique à lumière blanche (Leica, Nanterre, France) et analysées avec le logiciel Image J.

f) Quantification sous Image J

Quantification de fibrose (sous Image J) : Il est possible de quantifier le pourcentage du tissu fibreux par rapport au myocarde à partir des coupes colorées avec la coloration histologique Rouge Sirius. La macro sous Image J est la suivante :

- Changement de l'image en niveau de gris : [Image] > [color] > [channels tools] > [grayscale] > [channel2]
- Conversion de l'image en 8bit : [Image] > [type] > [8bit]
- Réglage du seuillage : [Image] > [adjust] > [threshold] (les pixels noirs correspondent aux zones de fibrose)
- Sélection de la zone délimitant la coupe (si besoin) : [freehand selections] > dessin du contour de la coupe > [T ou add ROI MANAGER]
- Analyse de la zone sélectionnée : [Analyze] > [measure]
- Area : aire de la zone sélectionnée
- %area : Pourcentage de pixel noir/pixel blanc permettant de calculer le pourcentage de fibrose

Avec cette méthode, nous obtenons donc une surface totale et une surface où la fibrose s'est installée. Il est alors possible d'en déduire le pourcentage. Une moyenne des pourcentages de fibrose de l'ensemble des images pour un même échantillon est effectuée afin d'obtenir un pourcentage moyen de fibrose par cœur.

Evaluation de la porosité des patches : De la même manière que précédemment, l'évaluation de la porosité des matrices après la greffe, a été effectuée avec Image J en déterminant la surface de zone poreuse par rapport à la surface totale du patch. Pour cela, à partir des images des colorations hématoxyline, la macro est la suivante :

- Changement de l'image en niveau de gris : [Image] > [color] > [channels tools] > [grayscale] > [channel2]
- Conversion de l'image en 8bit : [Image] > [type] > [8bit]
- Réglage du seuillage : [Image] > [adjust] > [threshold] (les pixels noirs correspondent aux zones non poreuses du patch)
- Analyse de la zone sélectionnée : [Analyze] > [measure]
- Area : aire de la zone sélectionnée
- %area : Pourcentage de pixel noir/pixel blanc permettant de calculer le pourcentage de porosité

Nous obtenons donc une surface totale et une surface correspondant aux patches non-poreux. Il suffit de soustraire la surface non-poreuse à l'aire totale pour en déduire la surface poreuse et ainsi obtenir un pourcentage.

Quantification des capillaires : Un comptage automatique des capillaires est possible après un immunomarquage dirigé contre la protéine CD31 ou cavéoline1alpha. Si le marquage est propre, un comptage des particules est alors possible selon la macro suivante :

- Conversion de l'image en RGB color : [Image] > [type] > [RGB color]
- Réglage du seuillage : [Image] > [adjust] > [color threshold] > [Brightness]

- Choix des paramètres de comptage : [Analyze] > [Analyze particules] > size (pixel²) :10 to infinity
- [Summary] > [count]

Quantification des cellules : Au cours de ce projet, beaucoup de quantification ont été réalisées avec Image J (nombre de cellules sur les patches, cellules Ki67positives ou SRF positives, et comptage de macrophages F4/80). Un comptage automatique n'a pas été possible, cependant il est possible de faciliter le comptage manuel de la manière suivante :

- Conversion de l'image en RGB color : [Image] > [type] > [RGB color]
- [Plugins] [Analyze] [cell counter]
- Avant de commencer le comptage, il faut initialiser l'image dans cell counter : [Initialize] > choix du type de point (1 à 8)
- Le comptage se fait quand l'outil [*Rectangular*] est activé
- A chaque clic de souris sur une cellule/un noyau a compté, le compteur avance
- Une sauvegarde des positions est possible : [Save markers]

Un comptage semi-manuel est réalisé sur toutes les images de l'échantillon puis une moyenne est réalisée pour obtenir un nombre unique par échantillon.

g) Expression génique

Les ARN totaux ont été extraits à partir des cœurs avec du Qiazol® et du système FastPrep®24 (MP Biomedicals, Illkirch, France) suivant les instructions du fabricant. Les ARN totaux à partir des cellules cardiaques dérivées des hiPS ont été extraites avec le kit SV total RNA isolation system (Promega, Charbonnières, France) suivant les instructions du fabricant.

A partir de 250 ng d'ARN extrait, le premier transcript ADNc a été synthétisé à partir du kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France) avec les primers anchored-oligo(dT)18 et selon les instructions du fabricant. La réaction de PCR a été réalisée avec le Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics), et a été effectuée en duplicat pour chaque échantillon. Le volume réactionnel final est de 6 µl et contient 3 µl du mélange SYBR Green Master Mix avec 500 nM des amorces sens et anti-sens, et 3 µl d'ADNc dilué (1 :25). Le programme pour la qPCR avec le SYBR Green est : 95° C pendant 8 min, suivie de 40 cycles à 95° C pendant 15 sec, 60°C pendant 15 sec et 72° C pendant 30 sec. Pour exclure les produits de PCR amplifiés à partir d'ADN génomique, les amorces ont été conçues, lorsque cela est possible, de manière à se lier à l'ADN au niveau d'une jonction exon-exon.

Une moyenne de l'expression de 3 gènes dont l'expression est stable : SRP72 (particule de reconnaissance du signal de 72kDa), SLC4A1AP (transporteur de soluté, famille n°4, échangeur d'anion, membre 1, protéine adaptatrice) et NUBP1 (protéine de liaison aux nucléotides n°1), a été utilisée comme valeur de référence. L'ADNc de

cœur d'une souris sham (opérée à blanc) a été utilisé comme calibrateur pour toutes les expériences. Les données ont été recueillies et analysées à l'aide de la version 1.5.0 du logiciel LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Les séquences des amorces utilisés sont résumées dans la liste suivante :

gène	sens	Anti-sens
b-MHC	5'AGGTGTGCTCTCCAGAATGG3'	5'CAGCGGCTTGATCTTGAA GT3'
Anf	5'ATCTGCCCTCTTGAAAAGCA3'	5'GCTCCAATCCTGTCAATCCT3'
Bnp	5'CAGCTCTTGAA GGACCAAGG3'	5'AGACCCAGGCAGAGTCAGAA3'
Actc1	5'CCCCTAGCAGCCTACAGAA3'	5'GAGCCATTGTCACACACCAA3'
Osteopontin	5'GCATTCCAAAGAGAGCCAGG3'	5'ACTAGCTTGTCTTGTGGCT3'
Timp1	5'ATATCCGGTACGCCTACACC3'	5'AAAGCTCTTTGCTGAGCAGG3'
Thy1	5'TGCAGGTTCAAGTCAGGGAAT3'	5'CCTGCACGGACTTAGATCCT3'
Col3a1	5'AAAGAGGATCTGAGGGCTCG3'	5'TCACCTCCAACCTCCAGCAAT3'
Col1a1	5'ATTCCCGTTCGAGTACGGAA3'	5'CTCGATCTCGTTGGATCCCT3'
SRP72	5'TGCTGCTGTGTTTACTCTG3'	5'GCAGCACCCCATTTCTTTCT3'
SLC4A1AP	5'CCTCTACGATCTGGGAAGCA3'	5'TCTGGTCCCTGCAGGATAAA3'
NUBP1	5'CAGAGGGGCTTCATGTCAAG3'	5'GATTCCTCTATAGCCGTGTCC3'

h) Statistiques

Tous les groupes ont été comparés de manière statistique en utilisant l'analyse des variances (ANOVA). Si nécessaire, une analyse post-hoc a été effectuée en utilisant le test HSD de Tukey avec le logiciel R. Pour les groupes qui ne passent pas le test de normalité (Shapiro-Wilk) ou de l'égalité des variances (Bartlett ou Fisher), des tests non-paramétriques ont été utilisés (Kruskal-Wallis) et les comparaisons multiples ont été faites suivant la procédure de Dunn dans le logiciel R. Les valeurs sont données en moyenne \pm SEM. Dans les figures, les astérisques indiquent les valeurs de p : [*] pour une p-value inférieure à 0,05, [**] pour une p-value inférieure à 0,01, et [***] pour une p-value inférieure à 0,001. Toutes les mesures sont effectuées en aveugle.

Résultats

1. Caractéristiques physiques des matrices de collagène

Au cours de la première étape du projet concernant l'obtention des matrices de collagène, différentes conditions de pontage ont été testées. Les matrices de collagène ont été préparées avec deux concentrations d'acide citrique différentes et, après électrospinning, les patches ont été chauffés à 150°C pendant trois temps différents.

Les différentes conditions sont résumées sur le tableau suivant :

Agent pontant	Temps de chauffe		
Acide citrique 5%	1,5 h soit 90 minutes	2h soit 120 minutes	2,5h soit 150 minutes
Acide citrique 10%	1,5 h soit 90 minutes	2h soit 120 minutes	2,5h soit 150 minutes

La structure des différentes matrices a été vérifiée par microscopie électronique à balayage. L'enchevêtrement des fibres a tout d'abord été analysé afin de vérifier la persistance de la porosité avant et après pontage et surtout après hydratation des matrices de collagène (*Figure 39*). On peut voir sur ces images SEM qu'avant et après le pontage, l'enchevêtrement des fibres n'est pas modifié. Les pores sont visibles et les fibres ne sont pas affectées. Après immersion dans l'eau, on peut remarquer que le pontage a permis le maintien de la structure fibreuse sans induire la décomposition des matrices. L'eau est venue combler les pores ce qui laisse supposer qu'au moment de l'ensemencement des matrices avec les hiPS, les milieux contenant les cellules en fera de même.

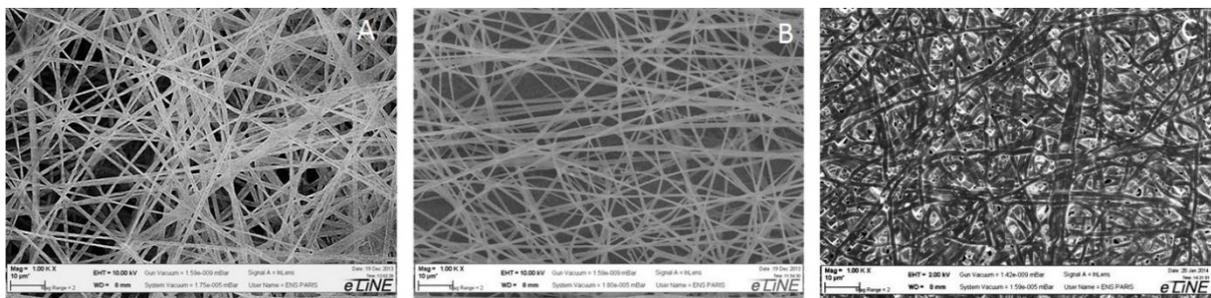


Figure 39 : Observation de l'enchevêtrement des fibres avant pontage (A), après pontage (B), et après immersion dans l'eau (C). Barre d'échelle (en bas à gauche des images) : 10µm.

Afin d'analyser plus précisément les fibres de collagène, des images SEM à plus fort grossissement ont été réalisées (*Figure 40*).

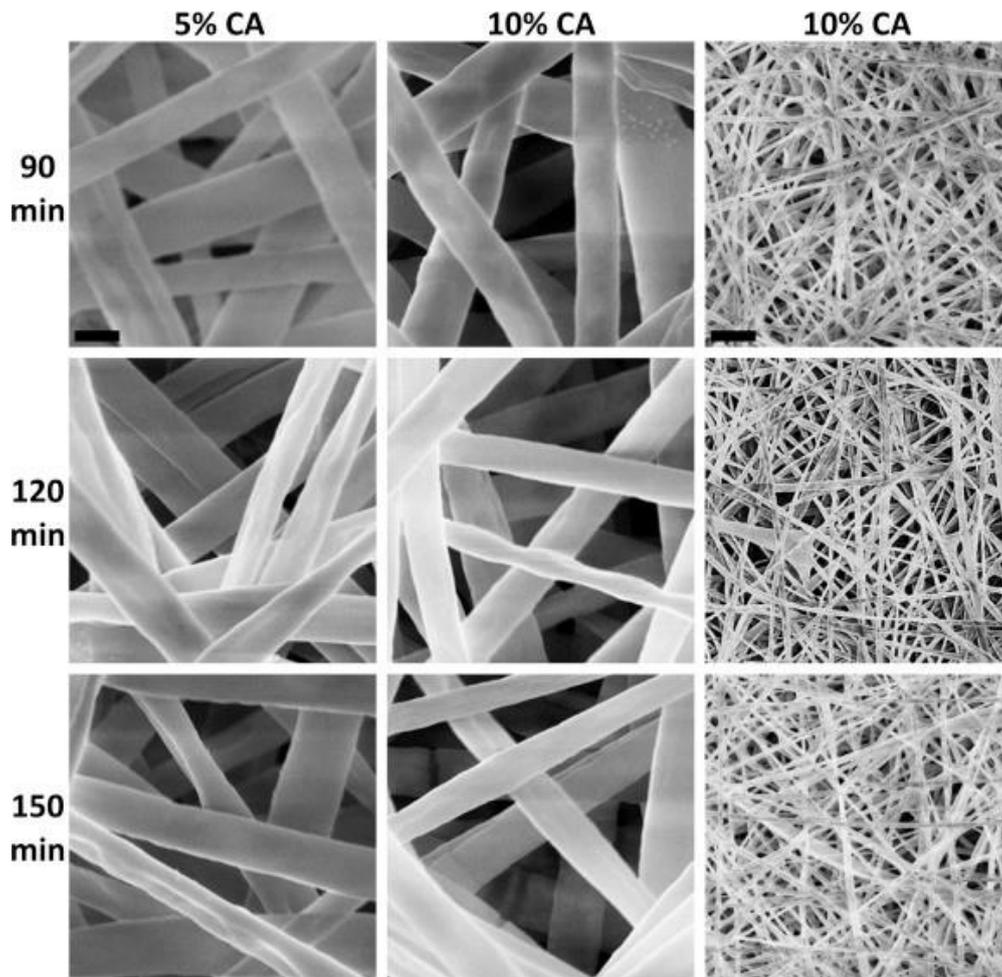


Figure 40 : Microstructure des matrices de collagène électrospinnées fraîches. Images de microscopie électronique à balayage à partir des différentes conditions de pontages avec différentes concentrations d'acide citrique (CA, 5% or 10%) et différents temps de chauffe à 150°C (90, 120 ou 150 minutes). Barre d'échelle : 1 μm (colonnes de gauche et du milieu), Barre d'échelle : 10 μm (colonne de droite).

On peut observer à partir de ces images qu'aucune différence significative n'est visible concernant la microstructure des matrices quelles que soient les conditions d'électrospinning testées. La taille des fibres ainsi que la taille des pores ont été mesurées à partir de ces images (Figure 41). Seules les données pour CA10% à différents temps de chauffe ont été représentées mais les résultats sont identiques avec CA5%. On peut déduire de cette figure qu'il n'y pas de différences concernant la taille des fibres et la taille des pores en fonction des différents temps de chauffe des patches. L'épaisseur moyenne des fibres est de 1500 nm (soit 1,5 μm) et la taille moyenne d'un pore est de 2500 nm (soit 2,5 μm). La porosité maximale avoisine les 7 μm ce qui indique que les cellules humaines ne peuvent pas migrer à travers la matrice sans modifier sa structure.

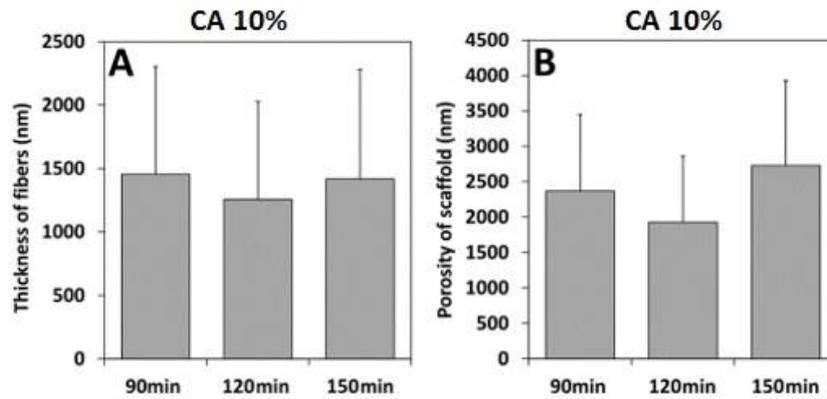


Figure 41 : Mesure de la taille des fibres (A) et de la taille des pores (B) en fonction des différentes conditions testées pour l'obtention des matrices de collagène.

L'élastographie par onde de cisaillement a été ensuite réalisée afin de déterminer l'épaisseur et l'élasticité des matrices de collagène obtenues (Figure 42). L'épaisseur des différentes matrices de collagène est de $400 \pm 50 \mu\text{m}$. L'élasticité des biomatériaux de collagène, évaluée avec le module de Young, augmente avec la concentration d'acide citrique et le temps de chauffe avec un pic pour les matrices 10%CA et 150 minutes de chauffe. Les matrices ont une élasticité de l'ordre de 10,1 kPa ce qui est comparable au tissu cardiaque en diastole (entre 10 et 20kPa).

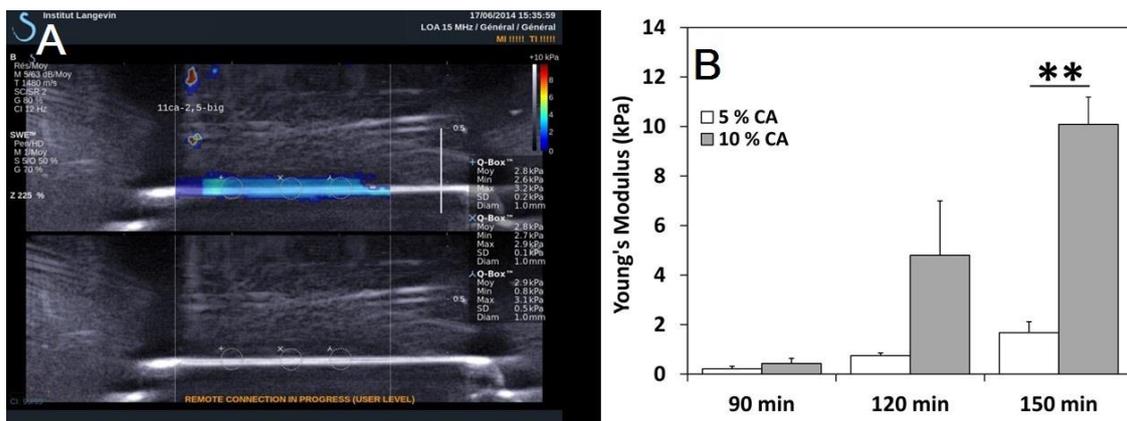


Figure 42 : Mesure de l'épaisseur (A) et de l'élasticité des matrices de collagène (B) par la technique d'élastographie par onde de cisaillement), **p-value<0.01.

L'effet de la préparation de la solution de collagène et de l'électrospinning sur la dénaturation du collagène a ensuite été étudié par dichroïsme circulaire (Figure 43). Le collagène AT04 est un atélocollagène de type I et III (présents majoritairement dans le myocarde cardiaque). Le collagène est une protéine hélicoïdale c'est pourquoi les ellipticités sont négatives. On peut remarquer que la préparation de la solution de collagène ne modifie pas la structure de la protéine (Courbe noire et bleue). En revanche, cette figure nous indique que, après électrospinning, l'ellipticité diminue d'environ 30%. Le collagène présent sur les matrices finales ne possède donc que 70% de structure hélicoïdale native.

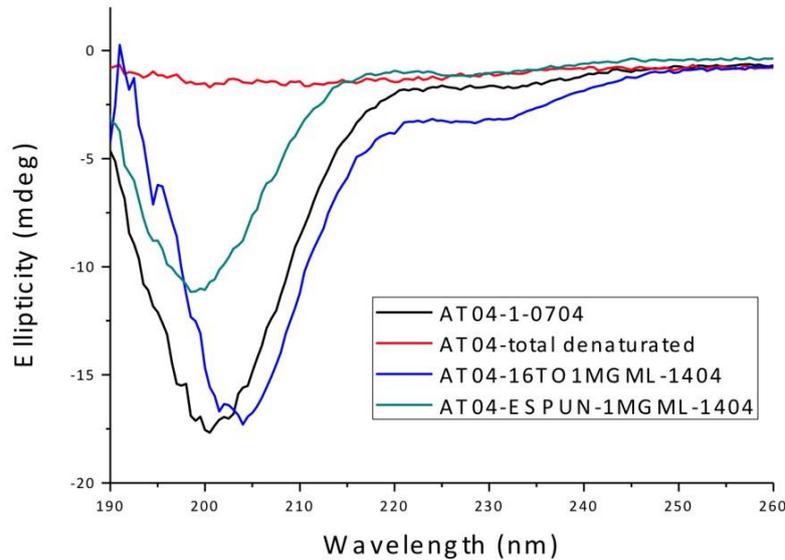


Figure 43 : Spectres obtenus par dichroïsme circulaire (ellipticité par rapport à la longueur d'onde) permettant l'étude de l'état de conformation du collagène au cours de la préparation des patches de collagène.

Afin de vérifier les propriétés de surface des patches de collagène, le test de mesure de l'angle de contact après dépôt d'une goutte d'eau à la surface a été réalisé (Figure 44). Dans un premier temps, une goutte d'eau a été déposée à la surface des patches avant pontage des matrices. On peut observer que cinq secondes après le dépôt de la goutte d'eau, la mesure d'angle est nulle car la goutte s'est complètement étalée ce qui signifie que les matrices ont capté l'eau. A ce stade les matrices sont donc très hydrophiles et poreuses. L'hydratation des patches sans étape de pontage induit sa dissolution complète. Les nanofibres se détachent les unes des autres. Après l'étape de pontage (ou cross-linking), l'angle de la goutte d'eau est de 50° ce qui correspond à un niveau moyennement hydrophile lié à l'étape de pontage. Avec le temps, la goutte s'étale et l'angle se réduit davantage à 30° . On peut en déduire que, malgré l'étape de pontage, les matrices en collagène gardent leur caractéristique hydrophile et possèdent la capacité d'absorber l'eau. Les matrices devraient donc être peu adhérentes à la paroi thoracique car elles possèdent une énergie libre de surface élevée. Les interactions eau-matrice en collagène sont ainsi de type polaire. De plus, les patches pontés sont capables d'absorber l'eau sans se désagréger. L'ensemble de ces informations est important pour anticiper la réaction des patches pendant l'étape de culture avec les cellules mais aussi pour la greffe. En effet, les matrices doivent pouvoir être lavées au PBS et supporter l'immersion dans un milieu de culture mais aussi doivent réagir correctement à la greffe (contact avec le cœur, tolérance des animaux). Ces informations apportent donc des premières données concernant la biocompatibilité des patches de collagène.

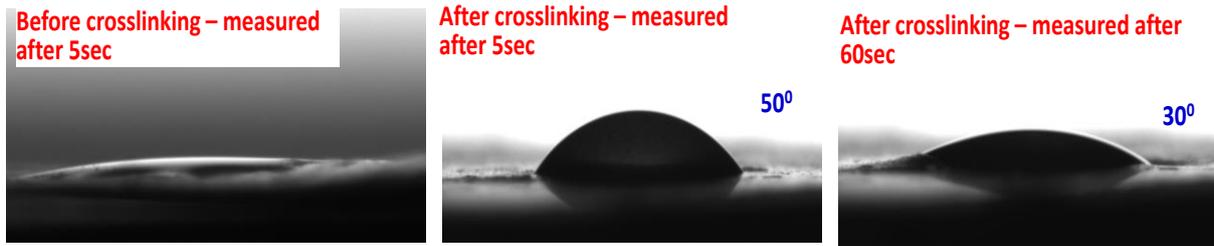


Figure 44 : Mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau à la surface des matrices de collagène avant pontage et après 5 et 60 secondes de pontage des fibres.

Pour conclure concernant les caractéristiques des matrices de collagène, nous pouvons dire que l'enchevêtrement des fibres est conservé après hydratation des matrices pontées. La taille des fibres est comparable, peu importe les conditions de préparation des patches, et est en moyenne de $1,5 \mu\text{m}$ avec une taille moyenne de pore de l'ordre de $2,5 \mu\text{m}$. La technique d'élastographie par onde de cisaillement a permis de définir l'épaisseur des patches qui est de $400 \pm 50 \mu\text{m}$ et d'évaluer le module de Young qui est de $10,1 \text{kPa}$ pour les matrices CA10% -150 minutes de chauffe soit une rigidité proche du myocarde en diastole. Malgré une dénaturation du collagène de 30% évaluée par dichroïsme circulaire, les matrices ont conservé une bonne capacité d'hydratation et sont donc hydrophiles. Cette première série d'expériences a permis de caractériser les matrices mais également d'apporter des éléments pour discriminer les différentes conditions d'obtention des matrices. L'étude de la biocompatibilité *in vivo* et *in vitro* nous permettra d'apporter d'autres éléments de sélection.

2. Biocompatibilité des matrices de collagène

La biocompatibilité des différentes matrices de collagène a été étudiée dans un premier temps *in vivo* en analysant la réaction des biomatériaux pendant l'implantation chirurgicale mais aussi l'étude des réponses vasculaire et immunitaire induites par la présence des patches acellulaires chez l'animal sain. L'étude de la biocompatibilité *in vivo* a été ensuite approfondie en vérifiant l'innocuité des patches acellulaires sur la fonction cardiaque des souris atteintes de cardiomyopathie dilatée. Dans un second temps, la biocompatibilité *in vitro* a été testée en cultivant différents types cellulaires (cellules cardiomyoblastes H9C2 et cellules cardiaques de rats nouveau-nés) directement sur les matrices de collagène pour étudier le comportement de ces cellules en contact avec les matrices (survie et morphologie).

a) Biocompatibilité *in vivo* : implantation des matrices

Biocompatibilité des matrices acellulaires implantées chez des souris saines : Les matrices ont été greffées chirurgicalement sur le cœur de souris saines (C57Bl6j) pendant 7 jours. Les patches sont suturés directement sur le myocarde (après avoir déchiré le péricarde) selon les étapes représentées dans la figure ci-dessous :

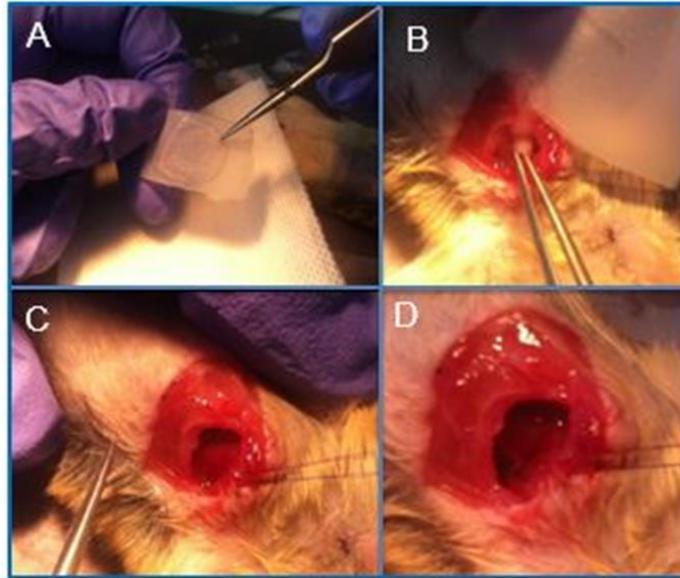


Figure 45 : Photos des différentes étapes de l'implantation chirurgicale des patches de collagène (sans cellule) A) dépôt du patch sur un support permettant le transfert de la boîte de culture au cœur, B) glissement du patch sur le cœur au niveau de l'incision, C) mise en place des sutures myocardique, D) patch suturé.

Au cours de l'implantation des matrices de collagène, différents paramètres ont été évalués de manière qualitative :

- *Maniabilité du patch* : le patch est-il facile à greffer ? est-il facile de l'attraper avec les pinces et de le manipuler ?
- *Résistance aux sutures* : le patch se déchire-t-il quand on le suture ? Pour rappel, le patch est suturé avec du fil 8/0 (2 à 3 points par patch). Un patch qui se déchire trop vite est un patch qui va partir en morceaux et donc être très difficile à greffer.
- *Adhérence à la paroi thoracique* : le caractère hydrophobe ou hydrophile des patches joue un rôle important dans la réaction de celui-ci vis-à-vis d'une surface à tendance sèche comme la paroi de la cavité thoracique. En effet, un patch qui est hydrophobe (c'est le cas de beaucoup de patches de synthèse tel que des patches en acide polylactique par exemple) va avoir tendance à se coller contre la paroi thoracique de l'animal ce qui va induire le développement des adhérences entre le cœur et le thorax et ainsi perturber la contraction cardiaque. Ce paramètre est en corrélation avec la mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau à la surface des biomatériaux.
- *Toxicité du patch* : un patch préparé avec des substances toxiques (tel que le glutaraldéhyde par exemple) va entraîner chez l'animal le développement de plusieurs mécanismes de rejets et sera assimilé par l'organisme comme un corps étranger. L'encapsulation du patch par un tissu fibreux, ainsi que le développement d'adhérence, la calcification et l'apparition d'une zone purulente sont autant de signes d'une absence de biocompatibilité et donc de la toxicité du patch pour l'animal.

- *Tolérance des animaux* : il est important de surveiller que l'animal ne soit pas gêné « mécaniquement » par la présence du patch. Un patch trop grand ou possédant une rigidité élevée et/ou une souplesse limitée peut perturber le cœur et les poumons dans leurs mouvements. Dans ce cas, la respiration de l'animal peut être perturbée et le cœur peut se mettre à fibriller.

Les résultats de ces observations sont résumés dans le tableau suivant :

Maniabilité du patch			
Temps de chauffe (min)	90	120	150
Acide citrique 5%	+	+	++
Acide citrique 10%	++	++	+++
Résistance aux sutures			
Acide citrique 5%	+/-	+/-	+
Acide citrique 10%	+	++	++
Adhérence du patch à la paroi thoracique			
Acide citrique 5%	non	non	non
Acide citrique 10%	non	non	non
Toxicité du patch			
Acide citrique 5%	non	non	non
Acide citrique 10%	non	non	non
Tolérance des animaux			
Acide citrique 5%	bonne	bonne	bonne
Acide citrique 10%	bonne	bonne	bonne

Tableau 7 : Analyses de différents paramètres concernant la greffe des biomatériaux en fonction des différents paramètres testés concernant la préparation des patches de collagène

On peut remarquer d'après ces informations que les matrices de collagène sont plus maniables quand les patches sont préparés avec 10% d'acide citrique ; de plus un temps de chauffe élevé semble rendre les patches moins fragiles et plus résistants aux sutures. Les matrices en collagène sont très bien tolérées par les animaux avec une absence de toxicité et une absence d'adhérence à la paroi thoracique. Après 7 jours d'implantation, les cœurs sont explantés et des coupes sont réalisées afin d'analyser histologiquement les patches et le myocarde greffés (*Figure 46*).

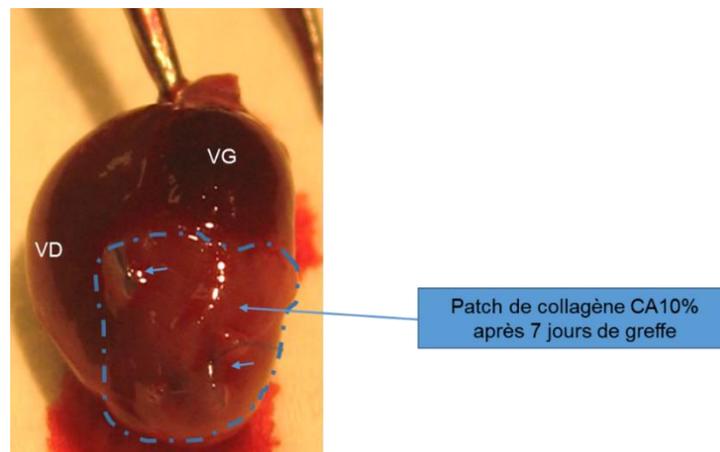


Figure 46 : Visualisation des patches sur les cœurs explantés après 7 jours de greffe ; la délimitation correspond aux bords du biomatériau en collagène, les flèches indiquent les points de suture qui ont servi à implanter les patches.

Nous pouvons ainsi voir que les matrices sont macroscopiquement visibles après 7 jours de greffe sur le cœur des souris saines. L'analyse histologique des patches a permis de comparer l'état des patches en fonction des différentes conditions d'obtention des matrices (*Figure 47*). On peut remarquer que, malgré les différents pourcentages d'acide citrique, les différents temps de chauffe, mais surtout les 7 jours d'implantation, les patches sont présents. Leur structure poreuse est intacte avec un début de dégradation notamment pour les patches chauffés pendant 90 et 120 minutes. Les patches chauffés pendant 150 minutes semblent être moins dégradés. Dans cette étude, la porosité est considérée comme un marqueur de résistance et de dégradabilité des matrices de collagène. Une quantification de la porosité des matrices greffées ainsi que de l'épaisseur a été réalisée et mise en corrélation avec le pourcentage de présence des patches (c'est-à-dire le nombre de patches présents après la greffe en fonction du nombre de cœurs greffés). Ces informations sont regroupées dans le *Tableau 8*.

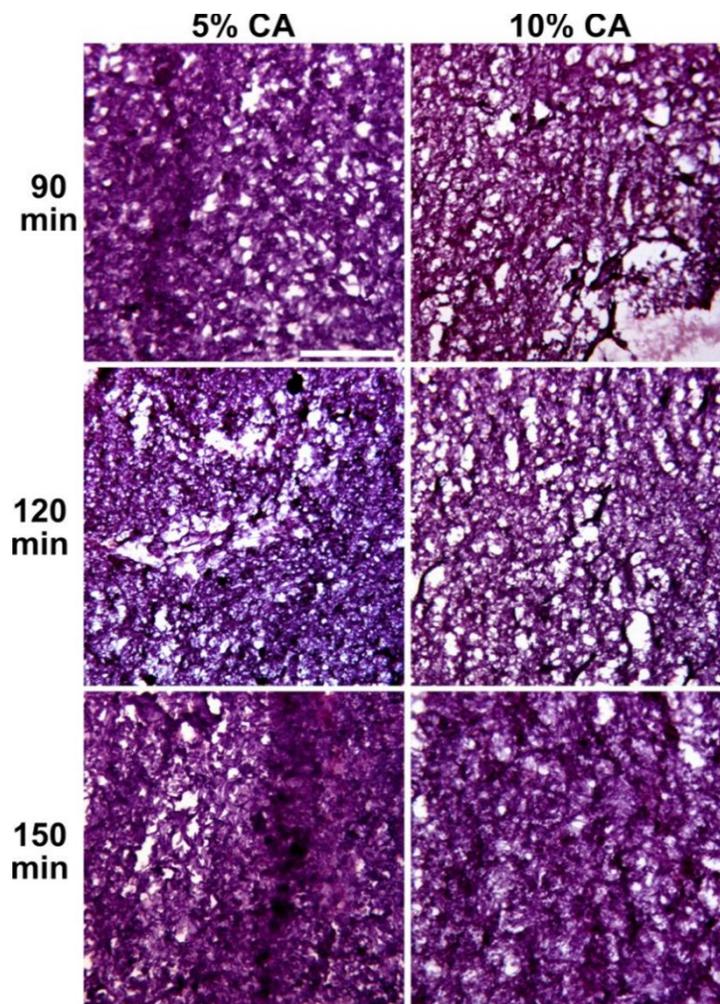


Figure 47 : Analyse de l'état histologique des matrices de collagène 5% et 10% CA qui ont été greffées pendant 7 jours sur la surface du cœur de souris saines C57BL6 (n=24). Ces images ont été obtenues après coloration hématoxyline-éosine. Barre d'échelle : 100 μ m.

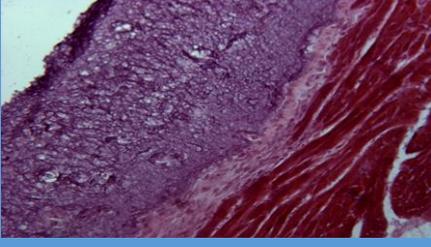
	% acide citrique	5%			10%		
		90	120	150	90	120	150
	Temps de chauffe (min)	90	120	150	90	120	150
	Effectif	N=3	N=3	N=3	N=3	N=3	N=3
	Présence (%)	66,67	66,67	100	100	100	100
	Porosité (%)	13,3	21,9	13,2	25	21,9	17
	Épaisseur (mm)	0,71	0,79	0,66	0,44	0,87	0,73

Tableau 8 : Evaluation de différents paramètres d'étude des patches à partir des analyses histologiques

On peut déduire de ce tableau que le pourcentage d'acide citrique a une influence sur la survie des patches après la greffe. En effet, sur 100% des patches acide citrique 10% sont présents quelque soit le temps de chauffe. En revanche, un temps de chauffe élevé semble améliorer la présence des patches acide citrique 5%. La porosité est dans chaque condition plus élevée quand les patches sont pontés avec l'acide citrique 10% comparé aux mêmes temps de chauffe mais avec des patches pontés avec l'acide citrique 5%. L'épaisseur des patches est globalement meilleure pour les patches ayant été préparé avec 10% d'acide citrique sauf pour un temps faible de

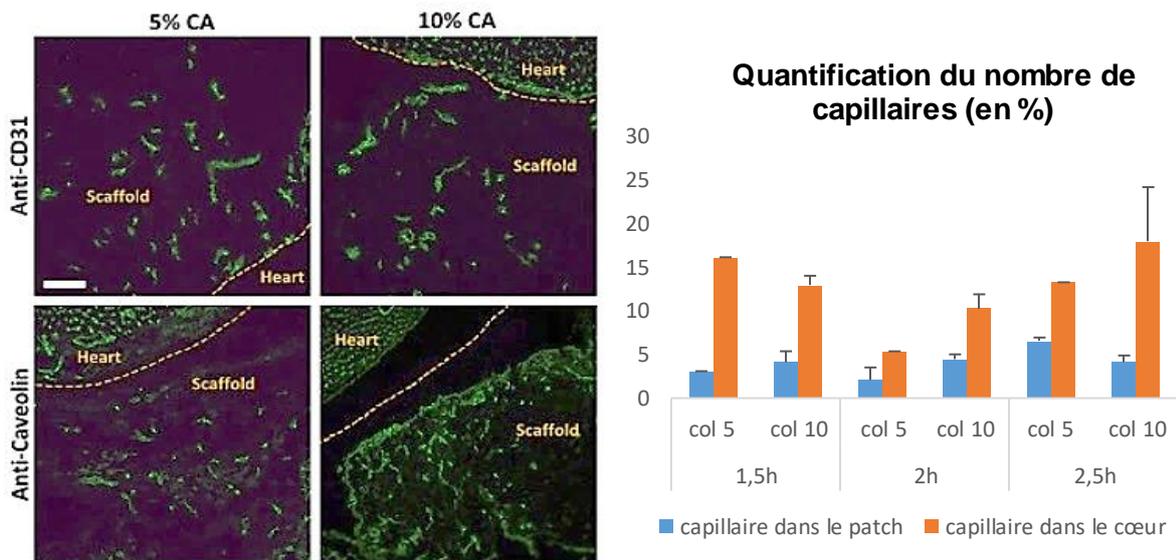


Figure 48 : Evaluation et quantification de l'infiltration des capillaires dans les matrices par un immunomarquage CD31 et Cavéoline 1 alpha. Barre d'échelle : 50µm.

chauffe. Pour faire un premier bilan, les quantifications de la présence des patches, de l'épaisseur et de la porosité, corrélées aux données sur la maniabilité et la résistance aux sutures, indiquent que, malgré l'absence de différences significatives, le pontage des matrices CA10% chauffées durant 150 minutes semble une condition plus intéressante que les autres conditions de pontage.

De plus, dans toutes les conditions testées, de nombreux vaisseaux sanguins ont été identifiés à proximité de la matrice et dans le myocarde proche de la zone greffée et mis en évidence par le marquage CD31 et cavéoline 1 alpha (*Figure 48*). Aucune différence significative n'est observée concernant le pourcentage de capillaire dans les patchs, le cœur et le cœur + les patchs. Les patchs sont bien vascularisés après 7 jours d'implantation sur le myocarde indépendamment des conditions de préparation.

Une étude de la prolifération cellulaire par immunomarquage Ki67 a également été réalisée afin d'analyser la présence de cellules en prolifération dans les patchs CA 5% et 10% (*Figure 49*). Aucune différence significative concernant le nombre de cellules en prolifération dans les matrices de collagène n'a été détectée. Concernant l'étude de la réponse immunitaire suite à la greffe des matrices, les immunomarquages F4/80 (macrophages totaux) ont été réalisés (*Figure 50*). Un nombre très faible de macrophages a été observé. Un immunomarquage CD206 pour identifier les macrophages de type M2 a été réalisé mais n'a donné aucun résultat. En effet, à ce stade d'implantation, la polarisation des macrophages est encore précoce, il n'est donc pas possible de savoir si ces macrophages sont pro (type M1) ou anti-inflammatoires (type M2).

Pour conclure concernant l'étude de la biocompatibilité des matrices de collagène acellulaire, on peut dire qu'au cours du processus d'implantation, les patchs sont maniabiles et facilement implantables. Ils possèdent une bonne résistance à la greffe et une bonne souplesse. La tolérance des animaux est bonne avec aucune

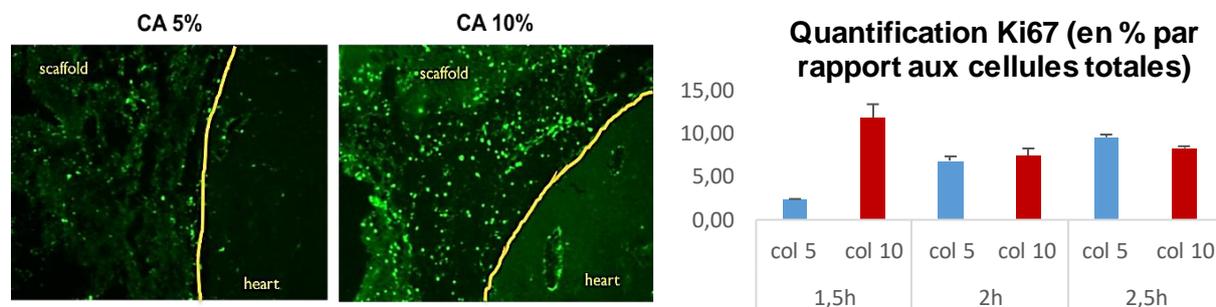


Figure 49 : Analyse et quantification du nombre de cellules en prolifération par immunomarquage Ki67. Barre d'échelle : 50µm.

infection induite ni aucune adhérence à la paroi thoracique. Après 7 jours de greffe, les patchs sont visibles sur les cœurs. Les patchs pontés avec l'acide citrique 10% et 150 minutes de chauffe semblent être plus présents avec une meilleure porosité et une meilleure épaisseur, signe d'une plus faible dégradation. Les patchs sont bien vascularisés après la greffe et activent peu l'apparition des macrophages. La présence de cellules en prolifération est importante mais non significativement différente selon

le pourcentage d'acide citrique. Il est alors possible de déduire que la biocompatibilité des matrices après la greffe chez des animaux sains est bonne.

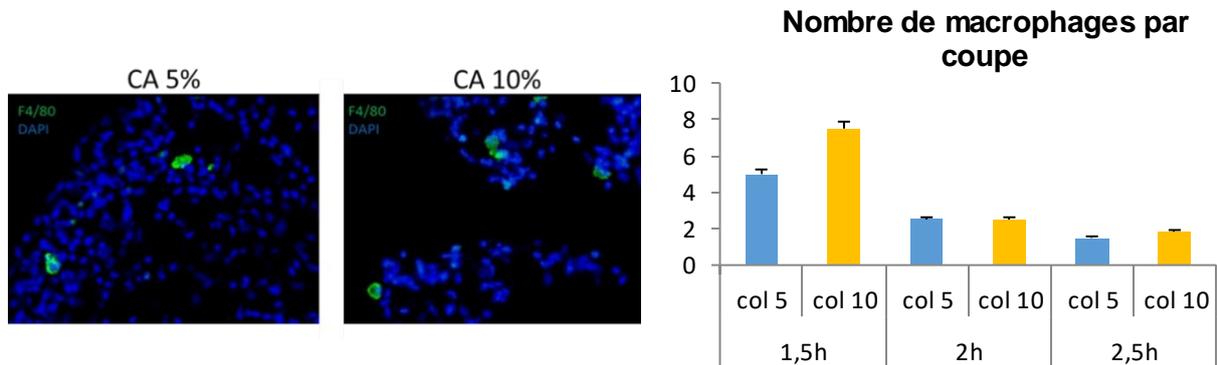


Figure 50 : Faible réponse du système immunitaire induite de la greffe des matrices de collagène sans cellules. Evaluation, après 7 jours d'implantation, de la présence de macrophage chez les souris saines C57Bl6 par immunomarquage avec un anti-F4/80 (vert) en comparaison de l'immunomarquage des noyaux avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle : 50 μ m.

Biocompatibilité des matrices acellulaires implantées chez les souris CMD : Afin de compléter les tests de biocompatibilité cellulaire cardiaque, nous avons vérifié au préalable que les matrices n'avaient pas d'effets délétères sur la fonction cardiaque des souris présentant une cardiomyopathie dilatée. Pour cela, les matrices 5% et 10% d'acide citrique sans cellules ont été greffées sur l'épicarde des souris α MHCMerCreSfSf. L'inactivation conditionnelle du gène floxé Serum Response Factor (SRF) par l'enzyme Cre, induite par des injections intrapéritonéales de tamoxifène (20 μ g/g/j ; Sigma-Aldrich, France) conduit au développement d'une cardiopathie dilatée.

Le modèle de cardiomyopathie dilatée a été vérifié en comparant l'expression de plusieurs gènes liés à l'inactivation du gène SRF et au développement de l'insuffisance cardiaque (Myh7, Actine cardiaque 1, Timp1, Collagène 3a1, et SRF) avec des souris saines (Figure 51). On peut voir sur ce graphique, que suite à l'injection de Tamoxifène, l'expression de SRF et de l'actine cardiaque 1 a fortement chuté. Le gène SRF est bien invalidé dans les souris α MHCMerCreSfSf. De plus, le gène Myh7 est 7 fois plus exprimé indiquant l'apparition de l'insuffisance cardiaque. Le cœur est en remodelage puisque les gènes Timp1 et collagène 3a1 sont également plus exprimés chez les animaux CMD que chez les animaux sains.

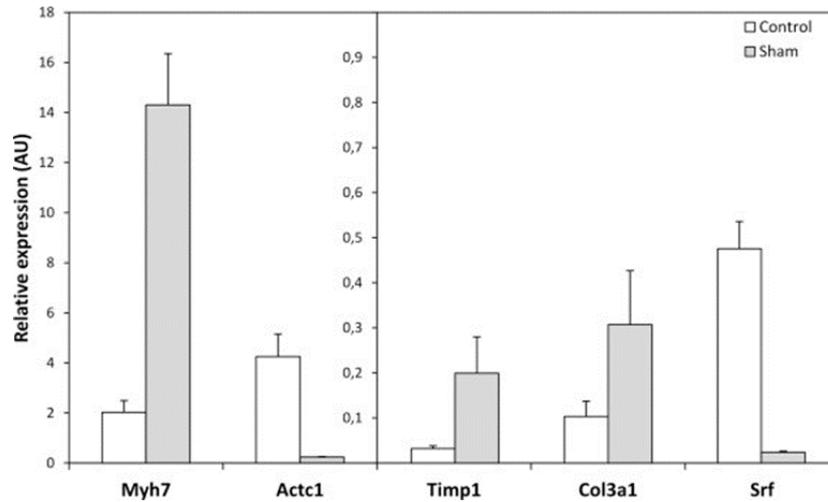


Figure 51 : Validation du modèle d'insuffisance cardiaque par comparaison de l'expression génique entre des souris saines C57Bl6 (contrôle) avec les souris α MHC-MerCreMer:SfSf après injection de tamoxifène sans traitement (Sham).

Après 14 jours d'implantation (soit 35 jours après les injections de tamoxifène), les volumes cardiaques en fin de diastole et en fin de systole, ainsi que les fractions d'éjections ont été mesurés. On observe chez les souris traitées par le tamoxifène, sans aucun traitement, une diminution de la fonction cardiaque (Figure 52). Aucune différence statistique n'a été constatée entre les animaux sham-opérés à blanc et ceux traités par les matrices - acide citrique 5% ou 10% sans cellules (n=6 par groupe) en termes de fonction cardiaque (Figure 52 A-B-C). De même, aucune différence n'a été observée concernant l'expression de marqueurs d'hypertrophie tels que la chaîne lourde bêta de la myosine (β -MHC), le facteur natriurétique atrial (ANF) et le peptide natriurétique du cerveau (BNP) (Figure 52 D-E-F). Ces résultats confirment que les matrices de collagène électrospinnées n'affectent pas défavorablement la fonction cardiaque.

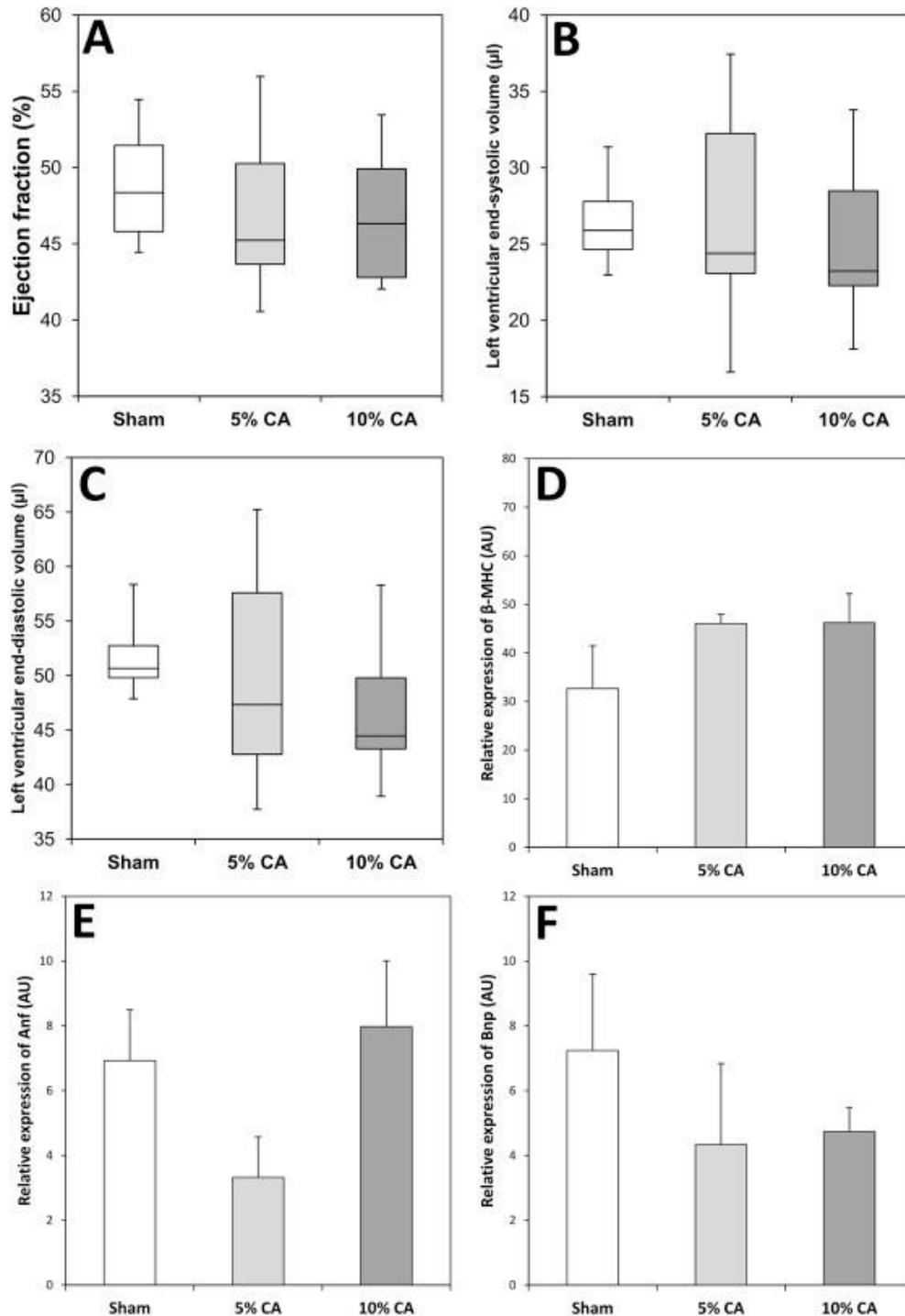


Figure 52 : Absence d'effets délétères sur la fonction cardiaque des matrices de collagène sans cellules. Evaluation, après 14 jours d'implantation, de la fraction d'éjection (A), du volume du ventricule gauche en fin de systole (B), du volume du ventricule gauche en fin de diastole (C) et de l'expression des gènes β -MHC (D), Anf (E) et Bnp (F) chez les souris α MHCMerCreMer :Sf/Sf.

b) Biocompatibilité *in vitro* : cellularisation des matrices

La cellularisation des matrices est une étape très importante dans le développement d'un nouveau produit de thérapie cellulaire. En effet, c'est une étape qui est très limitante et beaucoup de matrices qui ont été testés au cours des précédentes études de l'équipe du Pr. Agbulut, ont été éliminées à cette étape. Le protocole d'obtention des cellules souches pluripotentes humaines étant très couteux

en temps et en argent, les tests de cellularisation des matrices ont d'abord été faits avec des cellules plus faciles d'obtention et dont le phénotype est peu éloigné des cardiomyocytes humains. Ainsi, dans un premier temps les cardiomyoblastes H9C2 et les cardiomyocytes issus de cœurs de rats nouveau-nés ont été utilisés.

La biocompatibilité des matrices *in vitro* a donc été évaluée dans un premier temps par des expérimentations utilisant des cardiomyocytes de rats nouveaux nés (*Figure 53*). Les cellules sont cultivées pendant 3 jours sur les patches en collagène puis un immunomarquage α -actinine, Nkx2.5, et nucléaire est réalisé. On peut remarquer de suite une différence significative concernant la colonisation des cellules en fonction du pourcentage d'acide citrique. Ces observations ont été validées par le comptage des cellules α -actinine positives. En effet, d'après les images, peu de cardiomyocytes ont colonisé les patches préparés avec 5% d'acide citrique en comparaison avec 10%. On peut remarquer également que toutes les cellules ne sont pas positives pour α -actinine ou Nkx2.5, ce qui était attendu étant donné la présence de fibroblastes contaminants dans la culture cellulaire. La quantification du ratio entre cardiomyocytes et cellules non cardiomyocytes après trois jours de culture indique, cependant, que la matrice de collagène pontée avec 10% d'acide citrique permet une meilleure colonisation des cellules dans les matrices. De plus, les cellules cardiaques sont plus grandes avec une meilleure morphologie et une structure sarcomérique bien organisée. Il est cependant difficile d'établir une différence concernant les différents temps de chauffe des patches préparés avec 10% d'acide citrique. C'est pourquoi, une seconde étude a été réalisée.

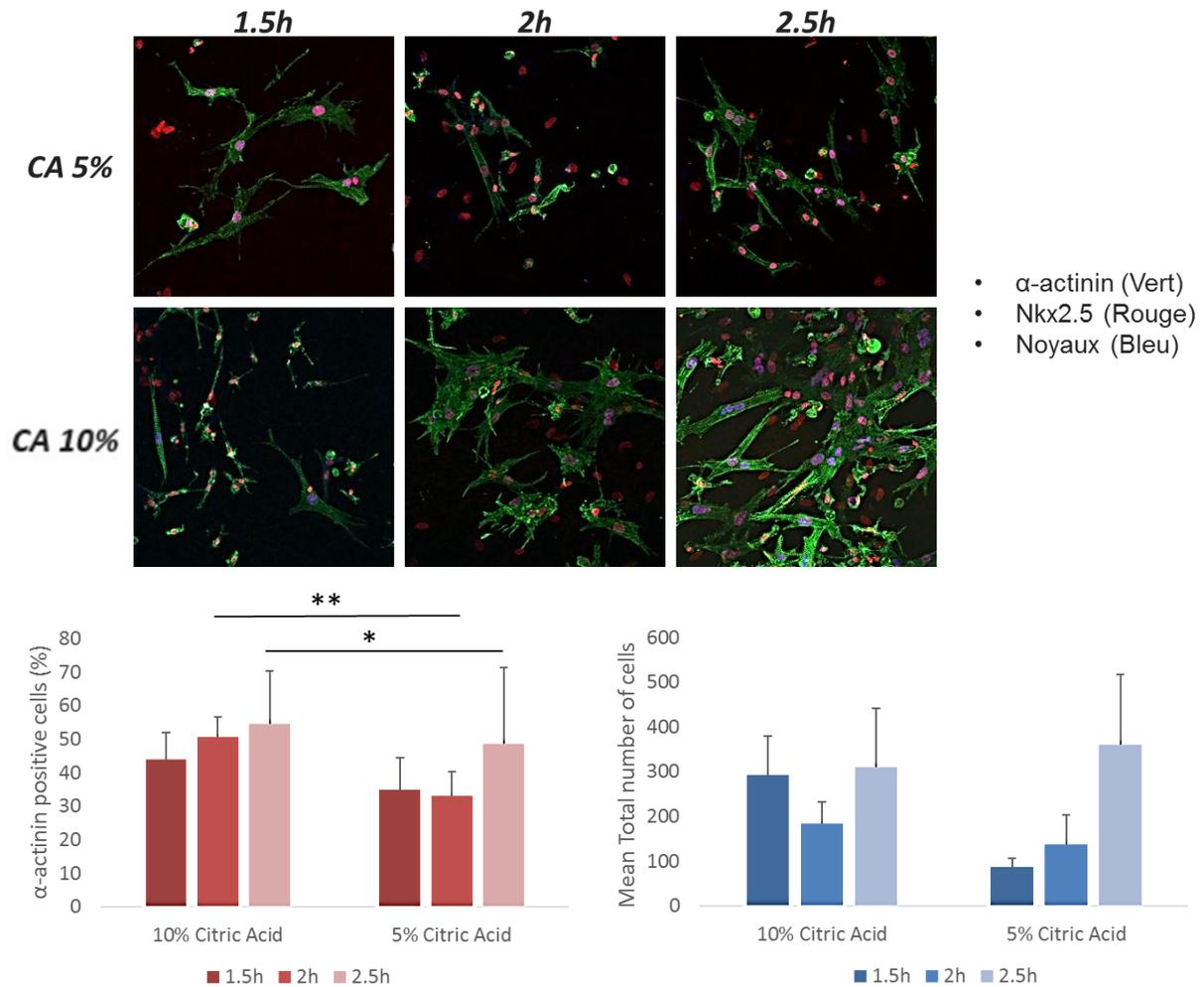


Figure 53 : Nombre de cardiomyocytes de rats nouveau-nés sur les matrices, exprimées en pourcentage de cellules totales, après 3 jours de culture. Les cellules ont été immunomarquées avec un anticorps α -actinine (vert) et Nkx2.5 (rouge); les noyaux apparaissent en bleu avec un marquage Hoescht 33342. Barre d'échelle : 100 μ m.

*p-value<0.05, **p-value<0.01.

Dans un second temps, les cellules H9C2 ont été ensemencées pendant 48 heures sur les patches - acide citrique 10% à différents temps de chauffe. Des marquages actine et nucléaire ont ensuite été réalisés par la phalloïdine pour identifier les cellules sur les biomatériaux. Des images de microscopie confocale ont été obtenues afin d'étudier le positionnement des cellules dans les matrices de collagène 10% chauffées pendant différents temps (Figure 54). On peut voir d'après ces images, que les cellules H9C2 se sont étalées et ont colonisé les patches. Après 90 minutes de chauffe, les cellules sont majoritairement positionnées autour de 6 μ m (cellules vertes) mais quelques cellules ont migré plus profondément 12 μ m (cellules bleues). Après 120 minutes de chauffe, la colonisation par les cellules H9C2 est plus importante et les cellules sont une nouvelle fois majoritairement vers 6 μ m. Plus les matrices sont chauffées longtemps, plus les cellules semblent étalées et présentent une structure filamenteuse de l'actine. Quand les matrices sont chauffées 150 minutes, les cellules sont plus à la surface des patches (cellules rouges). La colonisation est très bonne. Il est possible de conclure de cette figure que la colonisation à 120 et 150 minutes est

très bonne cependant les cellules ont peu migré dans les matrices. Plus il y a de cellules, moins elles peuvent migrer en profondeur dans les patches. Ces résultats sont corrélés avec l'état de dégradation des matrices. En effet, les matrices qui ont été chauffées moins longtemps sont plus fragiles, les cellules vont donc plus facilement remodeler le collagène et migrer à l'intérieur. La migration des cellules dans les matrices est un paramètre important car cela améliorerait la capacité de rétention des cellules par les patches. Cependant, un remodelage trop rapide des matrices pourrait entraîner une dégradation trop importante pendant la culture, et poser problème pour la greffe. Une balance entre migration des cellules dans les matrices et dégradation de celles-ci est à définir.

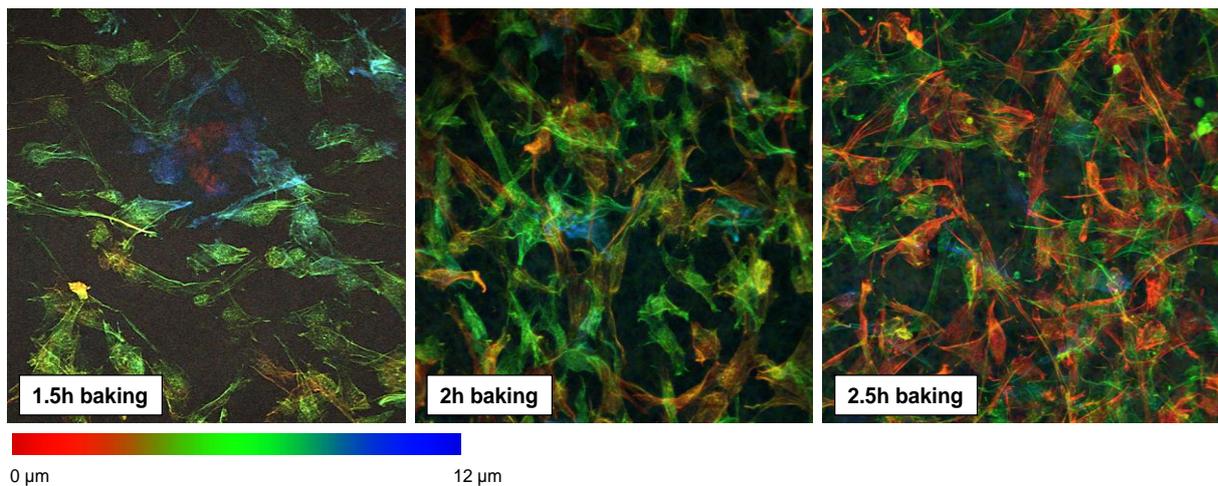


Figure 54 : Etude de la colonisation des cellules H2C2 après 48 heures de culture sur les patches 10% acide citrique. Images de microscopie confocale après immunomarquage des filaments d'actine (phalloïdine). Barre d'échelle : 100μm.

Les tests d'association de différents types cellulaires sur les matrices en collagène ont montré des résultats intéressants. Les cellulesensemencées sur les matrices sont capables de coloniser celles-ci tout en conservant un réseau de filaments d'actine normal. La colonisation des cellules est corrélée avec le temps de chauffe des matrices. Les patches 10% d'acide citrique chauffé pendant 150 minutes semblent être les meilleurs concernant le nombre de cellules présentes et la colonisation.

L'ensemble des données concernant la biocompatibilité *in vivo* et *in vitro* ont permis de mettre en évidence une bonne résistance des matrices à la greffe, une bonne tolérance des animaux, une faible dégradation avec une vascularisation importante et une faible réponse immunitaire. La porosité est maintenue et les patches sans cellules ne perturbent pas la fonction cardiaque des souris malades. De plus, les cellules sont capables de coloniser les matrices de collagène et se répartissent majoritairement à 6 μm de profondeur.

En regroupant toutes ces informations, il est possible de conclure que les matrices pontées avec 10% d'acide citrique et chauffées à 150°C pendant 150 minutes

correspond aux meilleures conditions d'obtention. Dans les études suivantes, les matrices CA10%-150 minutes seront les seules utilisées.

3. Association des matrices de collagène avec les hiPS-CM

a) Validation de la différenciation des hiPS en cardiomyocytes

Grâce aux résultats précédents, les matrices de collagène pontées avec 10% d'acide citrique ont été sélectionnées pour recevoir les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS-CM). En parallèle de la préparation des matrices de collagène, les cellules pluripotentes induites humaines ont été cultivées et différenciées selon les étapes décrites précédemment dans le protocole « GiWi » qui repose sur la modulation de la voie Wnt. Les cellules commencent à battre spontanément à partir de 8 à 10 jours de culture et sont récupérées après 15 jours de culture afin d'être analysées. Les données de la cytométrie de flux ont montré que plus de 70% des cellules récupérées expriment la troponine T cardiaque (*Figure 55*) et sont donc des cardiomyocytes. Le phénotype des cellules n'exprimant pas la troponine T cardiaque n'est pas connu mais il est possible que ces cellules soient majoritairement des fibroblastes et/ou des cellules endothéliales. Afin d'étudier plus en détail le phénotype cardiaque des cellules hiPS-CM, des immunomarquages Nkx2.5 et Islet 1 ont été réalisés. Les cellules hiPS-CM expriment les marqueurs précoces cardiaques Nkx2.5 et Islet 1 ainsi que la lamine A/C qui est le marqueur de cellules humaines que nous avons choisi. On peut voir d'après l'image C, que les cellules en culture forment un tapis dense de cellules jointives (marquage apha-actinine). Les cellules hiPS-CM possèdent donc bien un phénotype précoce cardiaque.

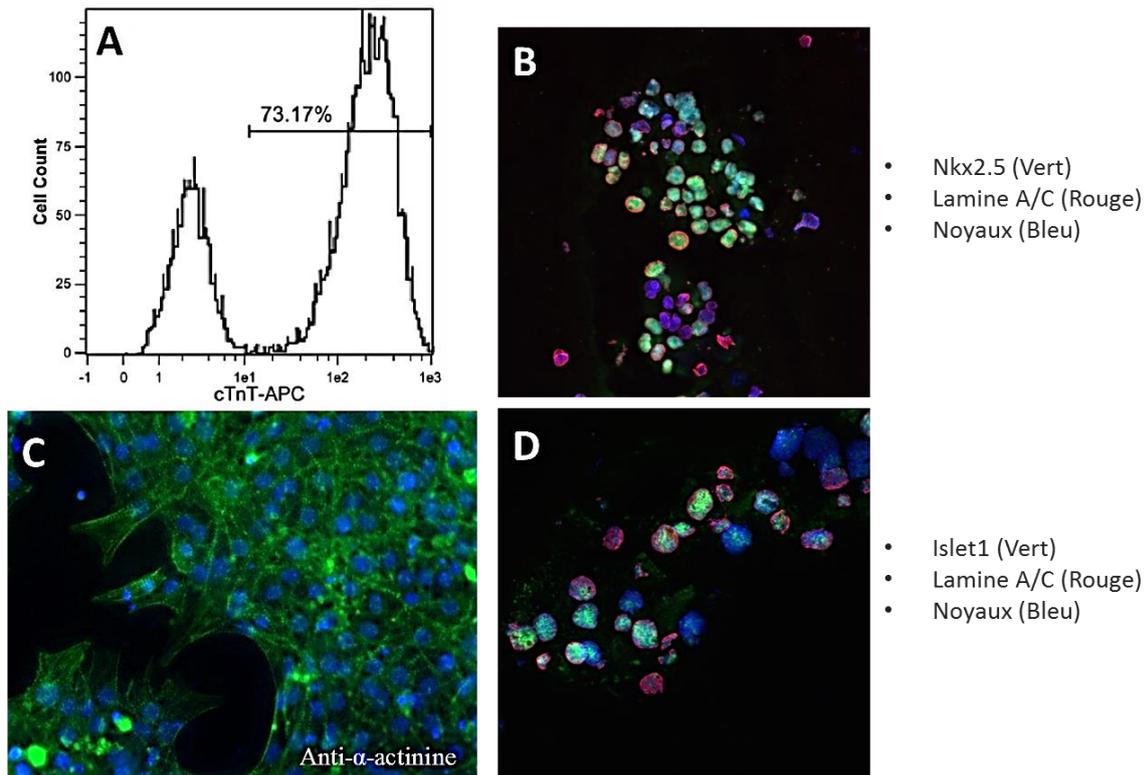


Figure 55 : Caractérisation des cellules hiPS après 15 jours de protocole de différenciation par cytométrie en flux (A) et immunomarquages Nkx2.5 (B), Islet 1 (B) et alpha-actinine (C). La détection des cellules humaines a été effectuée par immunomarquage Lamine A/C humaine.

Après la caractérisation des cellules par cytométrie et immunomarquages, un profil d'expression génique a été obtenu en étudiant l'expression de différents marqueurs au cours du protocole de différenciation des hiPS-CM : pluripotence (OCT4 et NANOG), mésendoderme (EOMES), mésoderme cardiaque (ISL1, MEF2C et GATA4) et maturité cardiaque (Troponine cardiaque et MLC2 cardiaque) (Figure 56). Après 4 jours de différenciation, ce qui correspond à 4 jours après l'ajout du CHIR99021, l'expression de marqueurs de pluripotence diminue fortement ce qui indique la perte de la pluripotence des cellules hiPS. Au cours de cette période, on peut observer un pic dans l'expression de EOMES indiquant le passage des cellules vers la voie mésendodermique. Après 5 jours de culture, après l'ajout de l'IWP2, l'expression des marqueurs du mésoderme cardiaque apparaît : ISL1 atteint un pic à J5 et MEF2C vers J7. L'expression de GATA4 augmente continuellement au cours de la différenciation avec un pic à J5, J7 et J9. L'expression de la troponine cardiaque débute à J5 et atteint son niveau maximal à J8. Les cellules hiPS-CM commencent à battre vers J10 ce qui est corrélé à la forte hausse de l'expression de MLC2 cardiaque. Ces informations permettent d'identifier différents paliers de différenciation au cours du protocole « GiWi » :

- J0 à J4 : perte de la pluripotence avec induction de la voie du mésendoderme
- J4 à J7 : transition des cellules vers la voie du mésoderme cardiaque

- A partir de J7 : expression des marqueurs cardiaques.

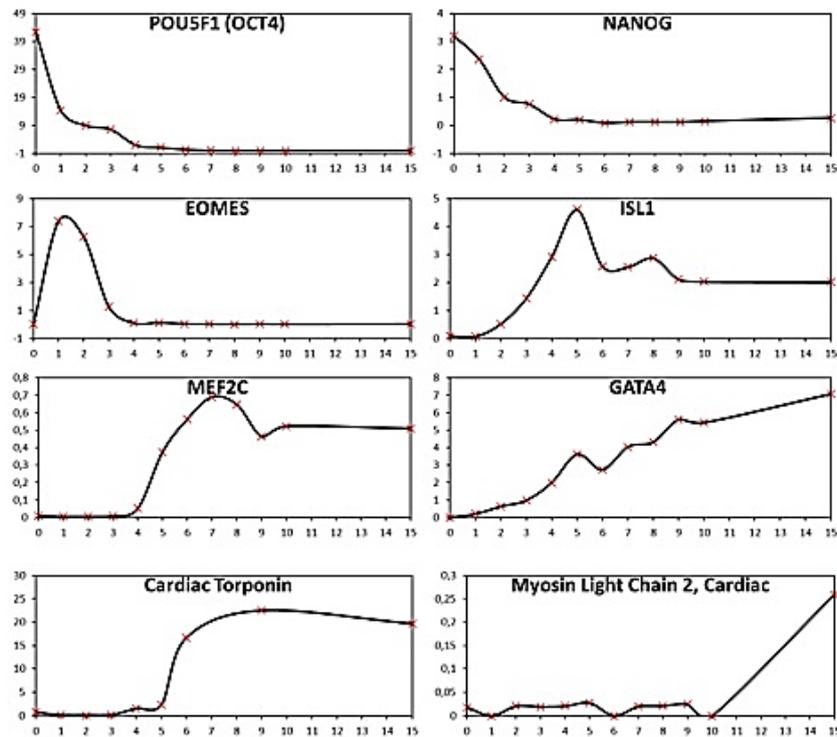


Figure 56 : Etude de l'expression de plusieurs marqueurs au cours de la différenciation des hiPS-CM : pluripotence (OCT4 et NANOG), mésendoderme (EOMES), mésoderme cardiaque (ISL1, MEF2C, GATA4) et maturité cardiaque (Troponine cardiaque, MLC2 cardiaque). Abscisses : nombre de jour au cours de la différenciation (0 = premier jour de différenciation avec ajout du CHIR99021).

b) Culture des hiPS-CM sur les matrices de collagène :

Ces cellules ont été cultivées pendant 3 jours sur les matrices de collagène. L'ensemencement des cellules a été réalisé avec des matrices CA 10% et 5%. Comme on peut le voir sur la *Figure 57*, les cellules ont colonisé les matrices et présentent une distribution régulière de la protéine sarcomérique α -actinine. Les sarcomères sont visibles sur les cellules ainsi que des noyaux positifs pour Islet1. Les matrices de collagène sont capables de suivre le battement des cellules cardiaques hiPS-CM ce qui indique une colonisation fonctionnelle et une bonne compatibilité entre les cellules hiPS-CM et leur support en collagène.

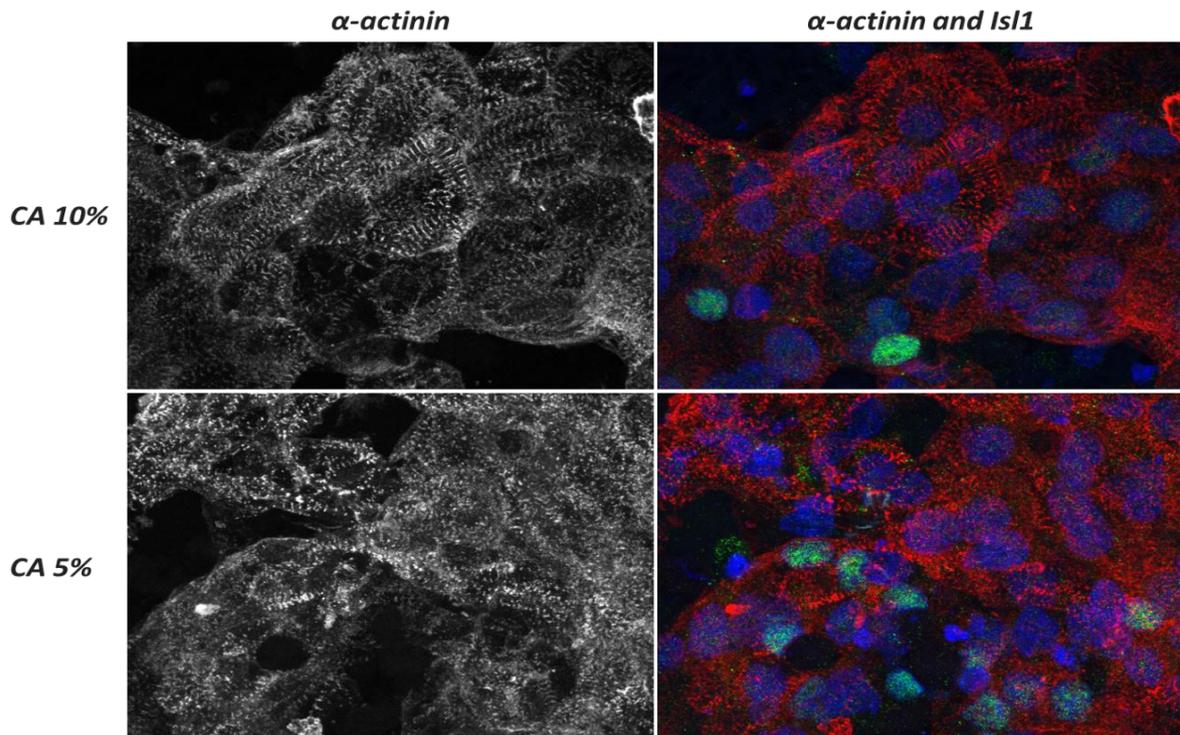


Figure 57 : Analyse de la structure sarcomérique des hiPS-CM cultivées sur les matrices de collagène pendant 3 jours.

4. Etude de la fonction cardiaque après greffe des matrices CA 10%+ hiPS-CM

Ces matrices cellularisées ont ensuite été implantées chez 8 souris α MHCMerCreSfSf après trois semaines d'induction par le Tamoxifène. Six matrices acellulaires (10% CA et 150 minutes de chauffe) ont été utilisées comme contrôle. Les paramètres fonctionnels des souris avant la greffe ne diffèrent pas de manière significative entre les groupes traités (matrices avec cellules hiPS-CM) et non-traités (matrices acellulaires) ($p > 0,05$) (Figure 58). A l'inverse, 14 jours après la greffe, tous les paramètres fonctionnels sont différents de manière significative entre les deux groupes ($p > 0,001$). Une élévation importante des volumes en fin de diastole et en fin de systole 14 jours après l'implantation est observée, par rapport au point de départ, chez les souris traitées avec les matrices sans cellules ($36,04 \pm 0,84 \mu\text{L}$ vs $27,81 \pm 0,64 \mu\text{L}$, $p = 0,001$; $51,77 \pm 1,50 \mu\text{L}$ vs $44,41 \pm 0,81 \mu\text{L}$, $p = 0,003$, respectivement). Au contraire, on observe une stabilisation des valeurs pour les souris traitées avec les matrices 10%CA + hiPS-CM ($22,32 \pm 1,73 \mu\text{L}$ au sacrifice vs $25,38 \pm 1,09 \mu\text{L}$ au départ pour le volume en fin de systole, $p = 0,28$ et $41,28 \pm 1,24 \mu\text{L}$ vs $43,33 \pm 1,20 \mu\text{L}$, pour le volume en fin de diastole, $p = 0,78$). La fraction d'éjection suit la même évolution. Cette amélioration de la fonction cardiaque est corrélée à une forte diminution de l'expression de β -MHC ($p = 0,044$) et une hausse de l'expression de l'actine cardiaque ($p = 0,044$). Les matrices de collagèneensemencées avec les hiPS-CM ont donc permis d'améliorer de manière significative la fonction cardiaque et de réduire

l'expression de gène de stress cardiaque comme β -MHC ainsi que d'améliorer la contractilité du myocarde (actine cardiaque 1).

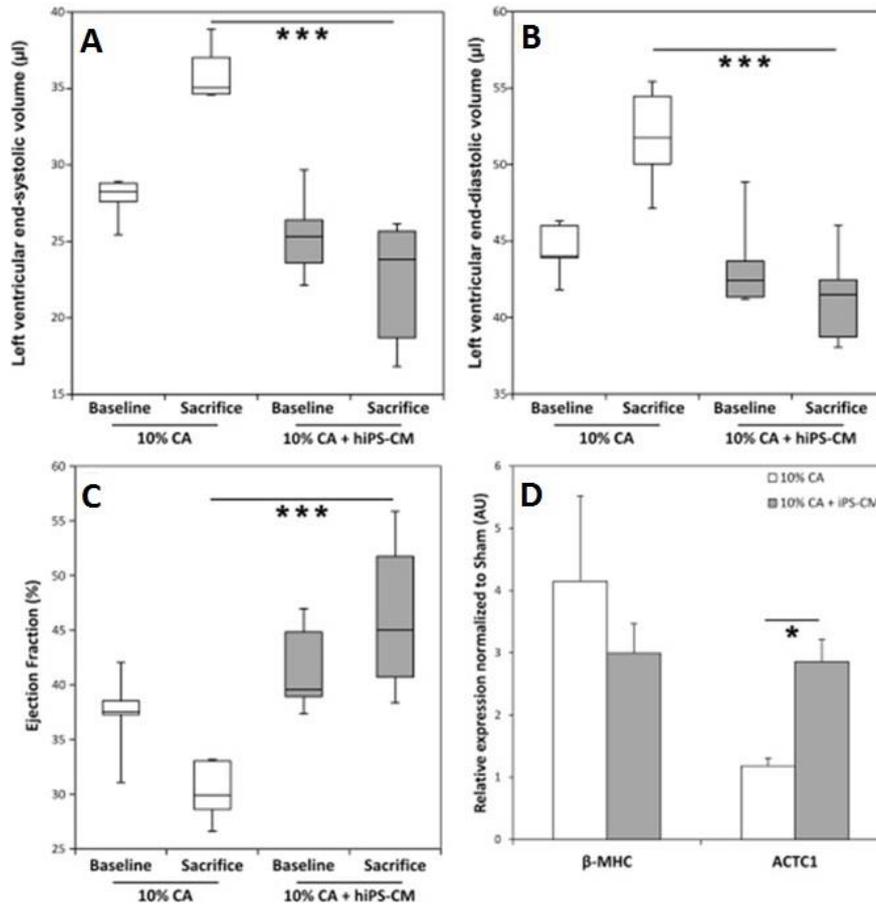


Figure 58 : Analyses de la fonction cardiaque des souris CMD avec des patches acellulaires ou des patches + hiPS-CM, Les volumes en fin de diastole (B) et en fin de systole (A) ont été mesurés ainsi que la fraction d'éjection (C). (D) Quantification relative des niveaux d'ARNm par PCR en temps réel pour quelques gènes liés au stress. β -MHC, chaîne lourde bêta de la myosine; ACTC1, actine α cardiaque ; * p -value<0.05, *** p -value<0.001.

Au moment des sacrifices des animaux, afin d'étudier de manière histologique les effets des biomatériaux de collagène associés aux hiPS-CM, des différences notables ont été observées concernant la physiologie animale (Tableau 9). En effet, à ce stade de la pathologie cardiaque, les animaux contrôle n'ont pas encore atteint les points limites définis par le comité éthique mais présentent les symptômes d'insuffisance cardiaque sévère : tremblements, akinésie (déplacements très lents), modification du pelage et du tonus musculaire associée à une perte de poids de \pm 15%. En revanche, les animaux traités par le patch de collagène cellularisé présentent une physiologie plus proche de la normale. Ces données sont corrélées avec l'amélioration significative de la fonction cardiaque observée lors des échocardiographies.

Souris CMD greffées avec des patches sans cellules (contrôle)	Souris CMD greffées avec des patches 10%CA + hiPS-CM
Tremblements excessifs	Pas de tremblement
Pelade et absence de vibrisses	Pelage normal
Akinésie	Kinésie
Faible tonus musculaire	Tonus musculaire normal
Perte de poids \pm 15%	Maintien du poids

Tableau 9 : Observations physiologiques des souris CMD après la greffe de patch acellulaire ou cellularisé avec les hiPS-CM.

5. Analyses histologiques des matrices CA 10%+ hiPS-CM après la greffe

Après le prélèvement des cœurs, des coupes ont été réalisées ainsi que des colorations histologiques (Hématoxyline-Eosine et Rouge Sirius - *Figure 61*) afin d'analyser morphologiquement les patches cellularisés ou non (CA 5% ou 10%) après la greffe et la réaction du myocarde. Les principales informations ont été regroupées dans le *Tableau 10*. La cellularisation des matrices a joué un rôle très important concernant la composition des matrices de collagène pontées avec 5% d'acide citrique. En effet, après 3 jours de culture sur les matrices, les hiPS-CM ont complètement dégradé les matrices CA 5%, elles n'ont donc pas pu être greffées. Cette donnée est corrélée avec les résultats des études précédentes qui laissaient présager de la fragilité des matrices préparées avec 5% d'acide citrique.

Le critère de présence des patches indique que la cellularisation des patches CA10% n'a pas modifié le processus de dégradation des matrices implantées. En effet, les patches sont majoritairement présents 14 jours après la greffe et l'épaisseur des matrices est similaire à celle des patches sans cellules.

Les données liées à la porosité des matrices 5% ou 10% sont semblables aux données précédentes. Les matrices de collagène CA10% sont cellularisées de manière importante car le pourcentage de pores « vides » est faible.

Caractéristiques des matrices		Souris CMD patch acellulaire		Souris CMD patch avec les hiPS-CM	
		5% - 150 min	10% - 150 min	5% - 150 min	10% - 150 min
Après 2 jours de greffe	Effectif	N=2	N=2	N=0	N=14
	Présence (%)	100	100	Non greffé	71,43
	Porosité (%)	12,6	15,1	Non greffé	4,2
	Epaisseur (mm)	0,67	0,96	Non greffé	0,72
Après 14 jours de greffe	Effectif	N=8	N=6	N=0	N=6
	Présence (%)	37,5	66,67	Non greffé	100
	Porosité (%)	13	16	Non greffé	5
	Epaisseur (mm)	0,51	0,60	Non greffé	0,57

Tableau 10 : Comparaison histologique des patches sans cellules et avec hiPS-CM après la greffe chez les souris CMD

6. Recherche des cellules humaines greffées

La colonisation des matrices de collagène, décrite précédemment lors de l'étude de la porosité des matrices, étant validée, la recherche de la nature des cellules qui

ont colonisé les matrices a été privilégiée. Pour cela, différents immunomarquages ont été réalisés afin de détecter la présence de cellules humaines sur les coupes de tissus murins. Après 14 jours de greffe, aucune cellule humaine ayant un phénotype cardiaque n'a été détectée dans les matrices cellularisées. L'analyse de la présence des cellules après 2 jours de greffe a également été effectuée par immunomarquage mais, de la même manière, aucune cellule n'a été détectée. Etant donné que les cellules étaient présentes sur les patches avant la greffe, deux hypothèses principales sont alors posées : soit les cellules n'ont pas survécu à la greffe (liée à la manipulation des patches lors de la greffe), soit les cellules ont été greffées mais sont entrées en mort cellulaire quelques temps après la greffe. Dans les deux cas, les effets fonctionnels observés sur le myocarde des souris greffées sont probablement dus à l'activation de voies de signalisations et l'induction d'effet paracrine faisant suite à la présence et à la mort des cellules hiPS-CM.

7. Etude de l'angiogenèse et de l'expression de SRF

Malgré l'absence des cellules hiPS-CM après la greffe, le mécanisme sous-jacent de l'amélioration de la fonction cardiaque a été étudié dans un premier temps en analysant la vascularisation des patches et du cœur induit par la présence des matrices cellularisées par immunomarquage CD31 et quantification du nombre de capillaires (mesure de la surface de capillaires par surface de tissu total ramené en pourcentage ; protocole identique lors de l'évaluation de la porosité des matrices) (*Figure 59*). Les immunomarquages CD31 ont montré que la présence de cellules hiPS-CM dans les matrices a permis d'augmenter l'angiogenèse en comparaison des matrices greffées sans cellules. Ces données sont corrélées avec les quantification de l'angiogenèse : le pourcentage de capillaires dans les patches ainsi que dans les cœurs tendent à augmenter en fonction de la présence de cellules hiPS-CM. Cette augmentation n'est cependant pas significative, il s'agit donc d'une tendance.

Il faut tout de même noter que les souris CMD ont été immunosupprimées. Nous pouvons supposer que la réponse angiogénique est différente de celle observée pour les évaluations de la biocompatibilité *in vivo* (Rajnoch et al. 2005).

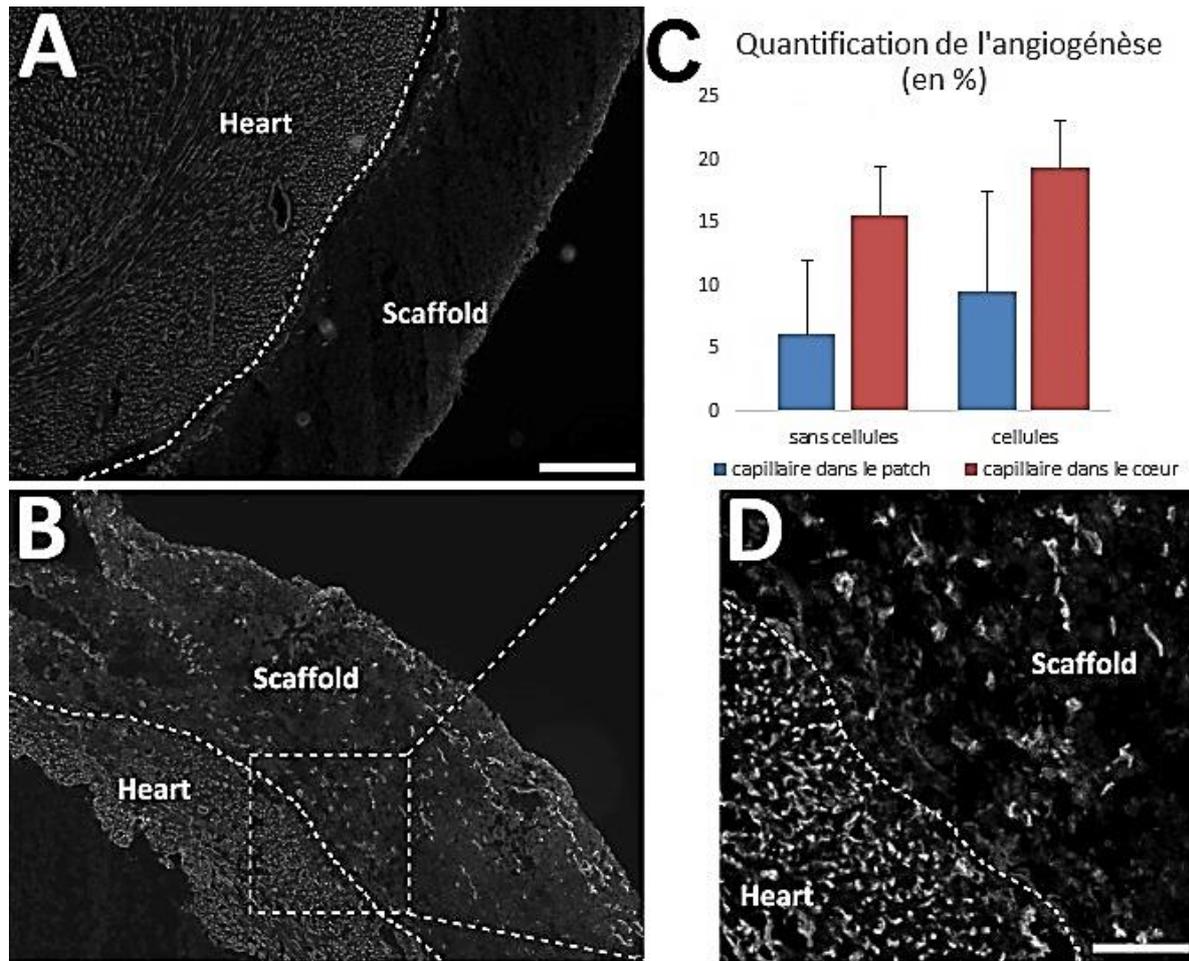


Figure 59 : Etude de l'infiltration de capillaires par immunomarquage CD31 (A-D) et de la densité capillaire par quantification de l'angiogénèse (C) chez les souris traitées avec des matrices 10% CA acellulaire (A) ou 10% CA+hiPS-CM (B et D). Barre d'échelle : 50 μ m (A-B), 250 μ m (D).

Après l'analyse de l'angiogénèse, la recherche de la présence de nouvelles cellules a été effectuée par immunomarquages Serum Response Factor (Figure 60, A-B). En effet, le modèle de souris atteint de cardiomyopathie dilatée est un modèle qui repose sur l'invalidation conditionnelle du gène SRF. L'expression relative du gène SRF est donc réduite de manière drastique dans le cœur (comme montré dans la Figure 51). Si, après injection de tamoxifène et invalidation conditionnelle de ce gène dans les cardiomyocytes, de nouveaux cardiomyocytes sont présents dans le myocarde (par différenciation de cellules souches résidentes par exemple), la présence de ces nouvelles cellules devrait être détectable par la réexpression du gène SRF. Une analyse de l'expression du gène SRF a donc été effectuée par immunomarquage SRF et quantification de l'expression relative par PCR en temps réel (Figure 60).

Chez les souris traitées par les matrices cellularisées, en comparaison des matrices sans cellules, une augmentation du nombre de cellules SRF positives est observée, associée à une hausse significative de l'expression du gène SRF. Le nombre de cellules exprimant SRF est donc augmenté de 3 fois ce qui suppose que de nouvelles cellules ont été recrutées. L'origine de ces cellules est difficilement

identifiable mais plusieurs co-marquages ont été réalisés et il semble que ces cellules soient majoritairement des cellules endothéliales et ne sont pas de nouveaux cardiomyocytes provenant de la différenciation de cellules souches résidentes ou de cellules souches issues de la moelle osseuse par exemple.

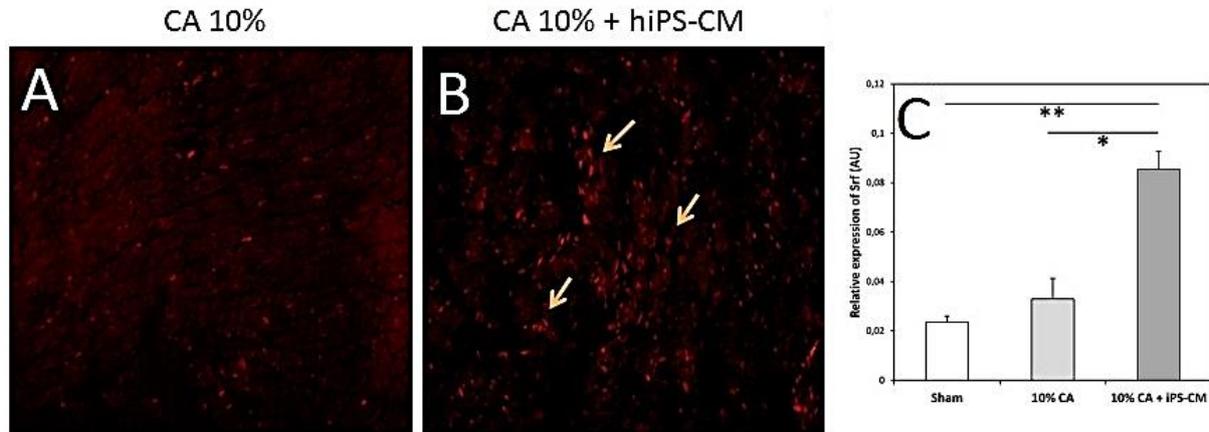


Figure 60 : Evaluation de l'expression du gène Serum Response factors par immunomarquage SRF en A) après implantation des patches CA10% sans cellules et en B) après implantation des patches CA10% associés aux cellules hiPS dérivés en cardiomyocytes. (C) Quantification relative des niveaux d'ARNm par PCR en temps réel du gène SRF. Barre d'échelle : 50 µm (A-B). *p-value < 0.05.

8. Adhésion des matrices de collagène avec le myocarde et remodelage matriciel

Les colorations histologiques hématoxyline-éosine ont permis d'analyser histologiquement les matrices greffées après 14 jours d'implantation sur le cœur dans tous les groupes. Cependant une analyse plus précise a mis en évidence des différences entre les deux groupes (Figure 61). Une fine couche de cellules interstitielles est présente entre le cœur et les matrices sans cellules (astérisques). C'est une réaction normale observée après la greffe d'un biomatériau naturel sur le myocarde (Londono et Badylak 2015). Ces cellules interstitielles ne sont pas présentes entre le myocarde et les matrices de collagène contenant les cellules hiPS-CM. La réaction du myocarde induite par l'implantation du collagène cellularisé est donc différente.

Une analyse des tissus après coloration Rouge Sirius ainsi qu'une quantification de la zone fibreuse ont été réalisées afin d'étudier la présence de fibres de collagène et ont permis de mettre en évidence la présence d'une grande quantité de fibres de collagène dans la zone de jonction myocarde/matrice de collagène. Le pourcentage global de tissu fibreux par rapport au tissu myocardique augmente de manière non significative. La présence de collagène en bordure des patches de collagène suggère que les matrices cellularisées adhèrent mieux au myocarde receveur que celles sans cellules. Cette adhérence peut être assimilée à une « intégration ».

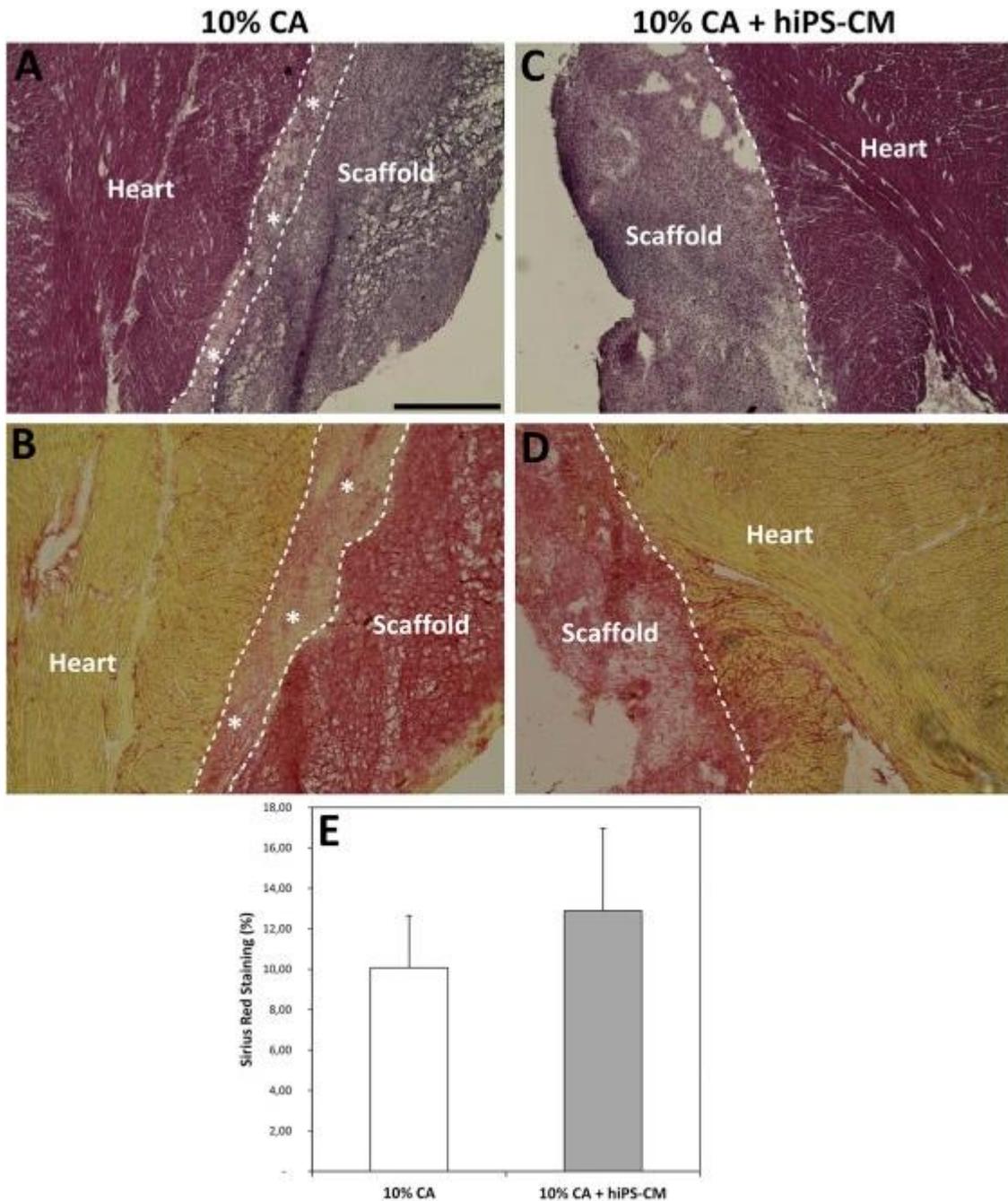


Figure 61 : Effets de la cellularisation des matrices sur la jonction biomatériaux/myocarde. Coloration histologique hématoxyline-éosine (A-B) et rouge Sirius (C-D) sur les matrices de collagène après 14 jours d'implantation 10% CA (A, C) et 10% CA+hiPS-CM (B, D). (E) Quantification relative de la zone fibreuse par coloration rouge Sirius par rapport à la surface totale de la section du ventricule gauche. Barre d'échelle : 400 μ m (A-D).

L'intégration des biomatériaux est associée au remodelage de la matrice extracellulaire. C'est pour cela qu'une étude de l'expression des Métalloprotéases a été effectuée (Figure 62). Il est possible de quantifier l'expression des MMPs par zymographie sur coupes. Les signaux de fluorescence correspondent aux zones où les MMPs sont actives. La greffe des matrices de collagène sans cellules entraîne l'augmentation de l'activation des MMPs (A et C). Inversement, les MMPs sont moins activés après la greffe des matrices associées aux hiPS-CM (B et D). Cependant, cette différence n'est pas significative. Le remodelage de la matrice extracellulaire intervient

au cours du remodelage cardiaque bénéfique mais également délétère. A ce stade d'étude, les souris CMD sont en insuffisance cardiaque sévère. Nous pouvons donc supposer que la greffe des matrices de collagène + hiPS-CM réduit l'activation des MMPs à l'origine du remodelage délétère de la matrice extracellulaire.

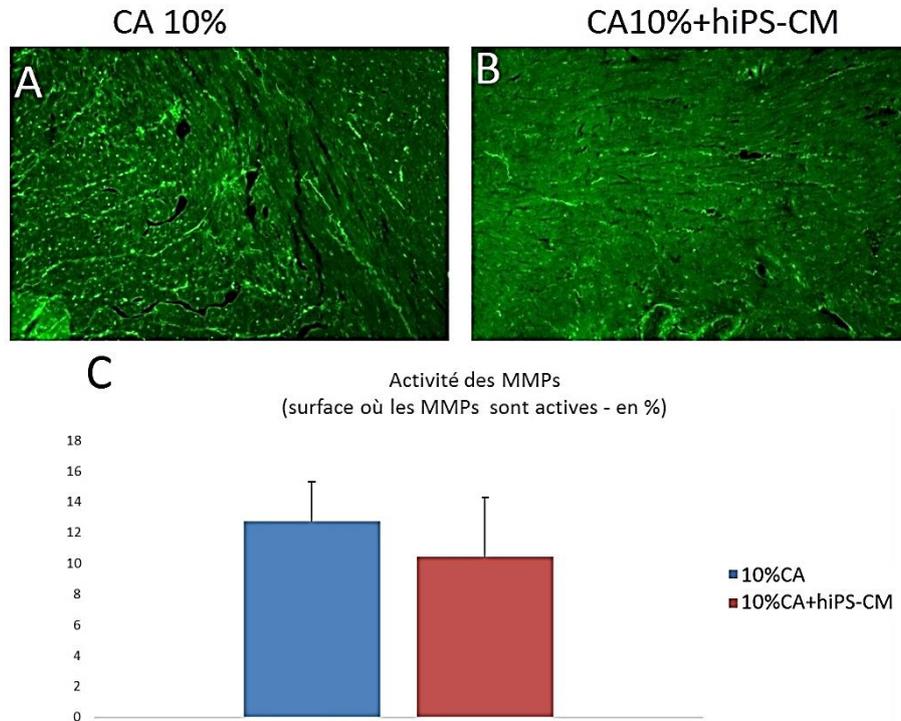


Figure 62 : Etude de l'activité des métalloprotéases par zymographie sur coupes et quantification de la surface où les MMPs sont actives (en pourcentage par rapport à la surface totale de tissu cardiaque)

Pour rentrer plus dans le détail du remodelage cardiaque, une étude de l'expression de plusieurs gènes liés au remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque a été réalisée (Figure 63). La baisse d'activation des MMPs est liée à la hausse d'expression des inhibiteurs des MMPs (ou TIMPs). L'ostéopontine est un régulateur important des MMPs et des TIMPs durant le remodelage et son activation induit la réduction de la dilatation du ventricule gauche après un infarctus du myocarde (Frangogiannis 2012). L'augmentation de l'expression de l'ostéopontine, après la greffe des matrices cellularisées, ainsi que la hausse de l'expression des collagènes 3a1 et 1a1 sont corrélées et suggèrent l'activation des mécanismes de remodelage bénéfique du cœur. La baisse de l'expression de Thy 1 (antigène des cellules du thymus 1) est liée à l'activation des fibroblastes et indique donc la diminution de la formation de fibrose cardiaque. Ces informations permettent de conclure sur la potentialisation de l'adhérence des matrices de collagène sur le myocarde induisant l'activation des processus de remodelage bénéfique de l'ensemble du cœur. En effet, les mesures d'expression des gènes liés au remodelage cardiaque ont été effectuées à partir de l'apex du cœur.

Dans cette étude, l'amélioration de la fonction cardiaque des souris CMD est donc dépendant de l'activation des systèmes de remodelage cardiaque induit par la

présence des cellules hiPS-CM sur les matrices de collagène. L'absence de cellules greffées suggère donc que ces mécanismes passent par l'activation de voies de signalisation de manière paracrine. Les matrices de collagène cellularisées adhèrent mieux au myocarde ce qui a sans doute contribué à une meilleure préservation de la géométrie du ventricule gauche dû à un possible soutien mécanique.

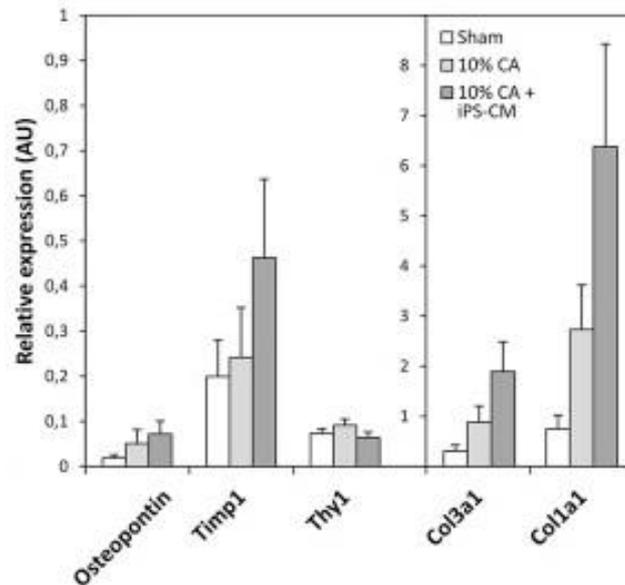


Figure 63 : Quantification relative des niveaux d'ARNm par PCR en temps réel pour plusieurs gènes liés au remodelage de la matrice extracellulaire comme *Timp1*, inhibiteur des métalloprotéases 1 ; *Thy1*, antigène des cellules du thymus 1 ; *Col*, Collagène.

Les objectifs principaux du développement des matrices de collagène n'ont pas été complètement atteints. Il est vrai que les matrices cellularisées ont permis l'amélioration de nombreux paramètres cardiaques, cependant l'absence des cellules hiPS-CM après la greffe est un paramètre nécessitant des améliorations.

Après la transplantation, beaucoup de cellules greffées sont perdues pour diverses raisons : stress mécanique ou cellulaire, ou dépendant de facteurs provenant de l'organisme hôte. La majorité des cellules greffées subissent ainsi une apoptose ou une nécrose, ce qui aboutit à la perte des signaux d'adhésion, une ischémie, une activation de l'inflammation et un rejet immunitaire. Il existe plusieurs techniques concernant l'amélioration de la greffe des cellules pluripotentes dérivées en cardiomyocytes (Don and Murry, 2013) :

- Bloquer les voies de signalisation pro-apoptotique par l'ajout par exemple d'un cocktail de pro-survie dans le milieu de culture des cellules
- Conditionner les cellules avant la transplantation en plaçant par exemple les cellules en milieu hypoxique
- Promouvoir l'angiogénèse en ajoutant dans le biomatériau des facteurs pro-angiogénique tel que VEGF
- Utiliser un immunosuppresseur plus puissant pour limiter le risque de rejet par l'organisme hôte

- Associer différents biomatériaux pour améliorer la rétention et la survie des cellules.

Dans la suite du développement des matrices de collagène, trois axes ont été sélectionnés :

- Axe 1 : promouvoir une amélioration de la rétention des cellules sur les matrices de collagène par ajout d'une couche protectrice de fibrine dans le but de retrouver les cellules après la greffe
- Axe 2 : améliorer l'orientation des nanofibres de collagène afin d'obtenir un tapis cellulaire mimant au mieux le tissu cardiaque
- Axe 3 : utiliser un support patterné (présence de motifs) en dessous des matrices de collagène pour améliorer la maturation des hiPS-CM.

9. Amélioration de la rétention des cellules sur les patches

Au cours de l'étude sur la caractérisation des biomatériaux et de la biocompatibilité *in vitro*, la colonisation des cellules sur les matrices de collagène avait été analysée par microscopie confocale et avait montré une colonisation très superficielle (6 μm de profondeur). Malgré la présence de pores, l'hypothèse, selon laquelle la rétention des cellules sur les matrices de collagène n'était pas suffisante pour permettre une greffe optimale, a été privilégiée.

En parallèle au développement des matrices de collagène, l'équipe du Pr. Agbulut et moi-même avons collaboré avec l'équipe du Pr. Menasché dans l'étude suivante : greffe de cellules précurseurs cardiaques (SSEA1 positives) associées à un patch de fibrine dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat Nude immunodéprimé (Bellamy et al. 2015). L'utilisation des hydrogels de fibrine a permis de retrouver les cellules précurseurs cardiaques plusieurs jours après la greffe (*Figure 64*).

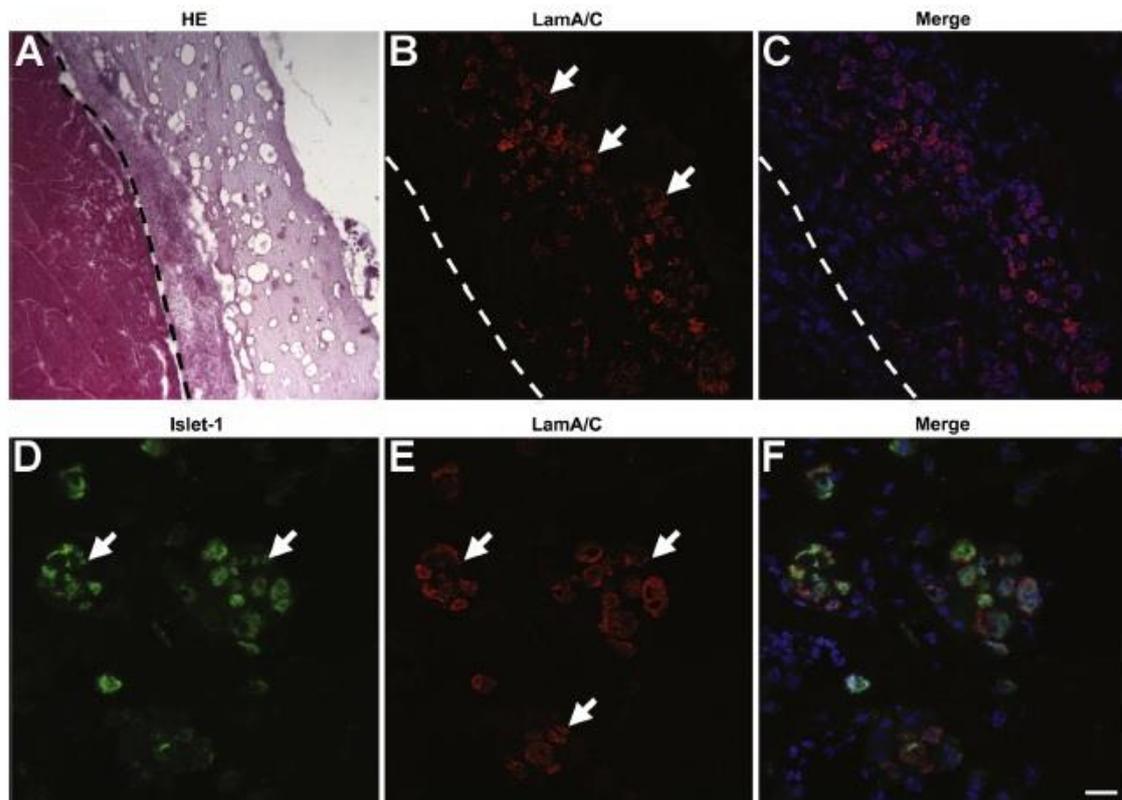


Figure 64 : Utilisation des hydrogels de fibrine pour la greffe des cellules SSEA1, A) Détection des patches avec les cellules SSEA1-2 jours après l'implantation. B à F) Des immunomarquages Lamine A/C (rouge) et Islet 1 (vert) ont permis de détecter la présence des cellules précurseurs cardiaques humaines. Les noyaux ont été marqués par Dapi (bleu). Barre d'échelle : A) 150 μ m, B, C) 50 μ m et D, E, F) 20 μ m.

Les hydrogels de fibrine, ayant montré des résultats intéressants dans cette étude, ont été testés pour la greffe des cellules hiPS-CM. Une nouvelle série de greffes a donc été réalisée en associant la fibrine aux matrices de collagène cellularisées chez des souris saines (C57Bl6) immunosupprimées (Figure 65). Pour cela, après culture des hiPS-CM pendant 48h sur les matrices de collagène, une fine couche d'hydrogel de fibrine est coulée afin de recouvrir entièrement les matrices de collagène cellularisées. L'hydrogel de fibrine aura donc un rôle protecteur pour permettre le maintien des cellules sur les matrices de collagène pendant le processus d'implantation. Après la greffe, la fibrine va se dégrader naturellement et les patches de collagène, ayant une capacité de dégradation beaucoup plus faible, adhéreront de nouveau directement au myocarde.

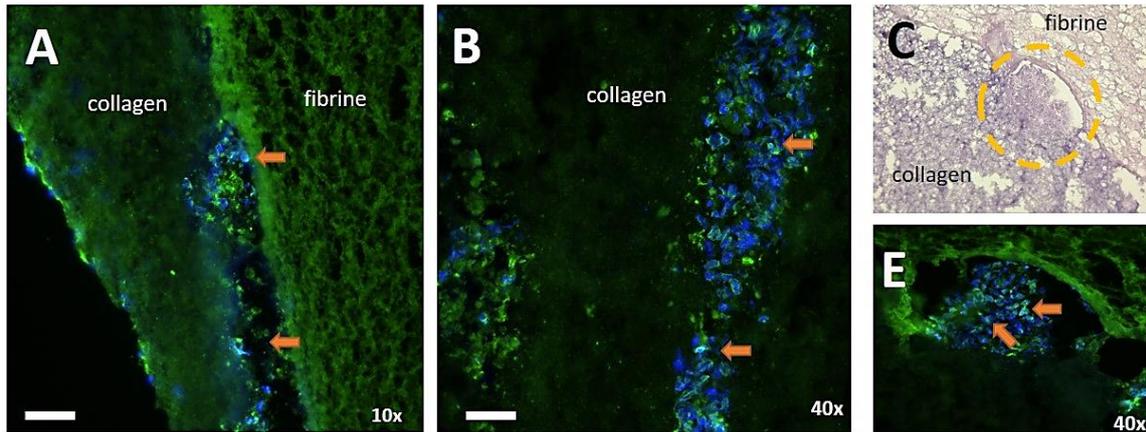


Figure 65 : Implantation des matrices de collagène +hiPS-CM associées à la fibrine chez des souris C57Bl6 immunosupprimées. A, B et E) Immunomarquage Lamine A/C (Vert) et noyaux (Bleu) ; C) Coloration hématoxyline-éosine ; barre d'échelle A-C : 150 μ m, B-E : 50 μ m.

Après 2 jours d'implantation des matrices de collagène cellularisées associées à la fibrine, des cellules humaines sont retrouvées (*Figure 65*) enchevêtrées entre la fibrine et le collagène. Les hiPS-CM sont en effet présents le long de la jonction fibrine/collagène (A) mais également à l'intérieur des matrices de collagène (B) et dans les pores formés par les nanofibres de collagène (E). Dans les pores, les cellules se sont regroupées en « cluster ». L'association des matrices de collagène avec l'hydrogel de fibrine a donc permis d'améliorer la rétention des cellules greffées sur les matrices.

Une amélioration de la porosité des matrices est également envisageable par l'association de la technique d'électrospray avec l'électrospinning en collaboration avec le Pr. Guy Schlatter. L'électrospray permet de pulvériser, au moment de la fabrication des matrices de collagène, de grosses molécules telles que des sels afin de laisser des « empreintes » dans les matrices. Ces empreintes correspondent à des pores de très grosses tailles ce qui pourrait améliorer la porosité et potentialiser la rétention des cellules des matrices.

10. Amélioration des matrices par alignement des nanofibres

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que les cellules cardiaques étaient capables de coloniser les matrices en collagène. Cependant les cellules n'avaient aucune orientation particulière et s'étaient étalées sur les matrices de manière aléatoire. Dans le tissu cardiaque, au sein du myocarde, les cardiomyocytes ont une orientation bien définie. C'est pourquoi, afin d'améliorer la maturation des hiPS-CM et de mimer au mieux le tissu cardiaque, nous avons choisi de faire évoluer les matrices de collagène en travaillant sur l'alignement des nanofibres.

Dans un premier temps, nous avons cultivé les cardiomyocytes issus de cœurs de rats nouveau-nés sur des matrices alignées en PCL vendues dans le commerce (*Figure 66*) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), l'objectif étant d'analyser la capacité d'organisation des cellules cardiaques le long des fibres alignées.

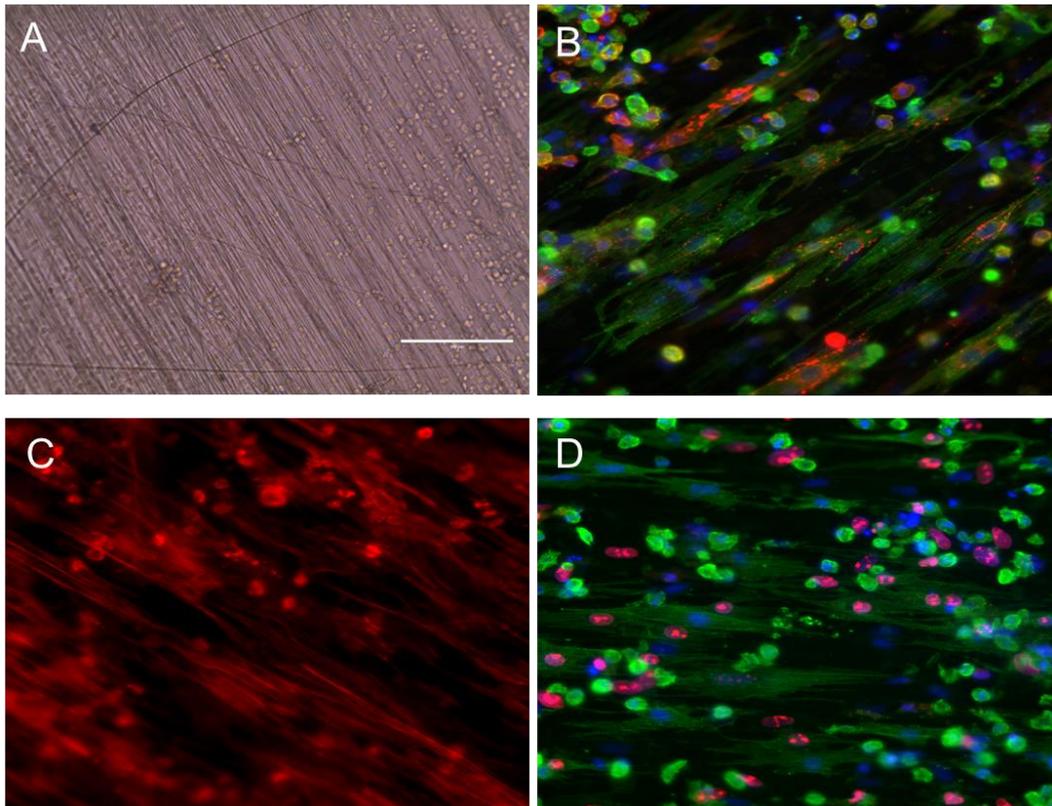
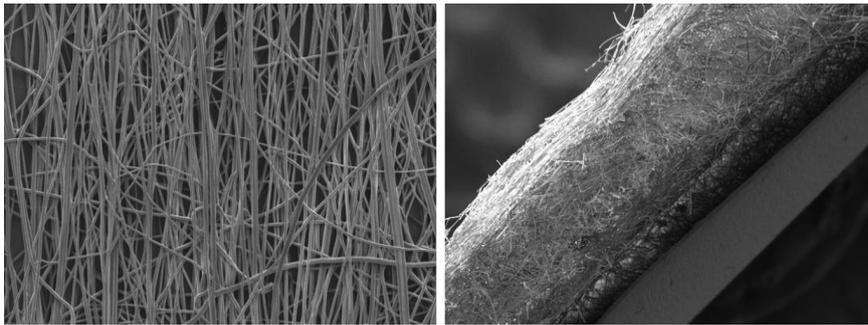


Figure 66 : Culture des cardiomyocytes de rats nouveau-nés sur des matrices alignées en PCL (Sigma Aldrich®)
 A) Cellules en culture (48h) sur les fibres PCL alignées (EVOS, Life Technologies); Immunomarquages après 7 jours de culture B) Connexine 43 (rouge) alpha actinine (vert) et noyaux (bleu); C) Phalloïdine (rouge); D) alpha actinine (vert) - Ki67(rouge) et noyaux (bleu); Barre d'échelle : A) 200µm ; B à D) 50µm.

Après 48h de culture sur les matrices en PCL alignées recouvertes de laminine (1 µg/cm²), les cardiomyocytes de rats nouveau-nés adhèrent au support et sont capables de se contracter de manière spontanée (A). Les cellules sont encore majoritairement de forme arrondie mais certaines commencent à s'allonger. Différents immunomarquages ont été réalisés afin d'étudier la morphologie des cellules. L'alpha actinine permet de repérer l'organisation des sarcomères des cardiomyocytes. La phalloïdine est une toxine qui se fixe spécifiquement sur l'actine des cellules. La connexine 43 est une protéine présente dans les zones de communication entre les cardiomyocytes. Enfin, Ki67 est un marqueur des cellules en prolifération. Les résultats montrent que, après 7 jours de culture, les cardiomyocytes se sont adaptés aux fibres alignées et s'étalent le long des fibres. Les cellules sont majoritairement des cardiomyocytes (C) et beaucoup sont en prolifération (D). Des connections entre-cardiomyocytes se sont également établies (B). Après 7 jours de culture sur des fibres alignées, les cardiomyocytes sont donc capables de s'orienter et de s'organiser.

L'étape suivante a donc été l'obtention des matrices alignées en collagène. Pour cela, des modifications dans la procédure de l'électrospinning ont été effectuées notamment la mise en place d'un collecteur rotatif avec une vitesse de rotation de 1215 tours par minute. Avec ce système rotatif, les nanofibres vont suivre le sens de rotation du collecteur et seront donc alignées. Différentes images SEM des matrices ont été obtenues afin d'analyser l'alignement des fibres et de déterminer les caractéristiques telles que le diamètre d'une fibre, la taille d'un pore, et l'épaisseur des matrices de collagène alignées (Figure 67).



Caractéristique des matrices de collagène en nanofibres alignées	
Diamètre des fibres	De 600nm à 2µm
Taille d'un pore	Inférieur à 30µm
Epaisseur	Inférieur à 200µm

Figure 67 : Images obtenues par SEM des matrices de collagène alignées vues de face et de profil. Grossissement 890x.

La nouvelle procédure d'obtention des matrices de collagène a modifié considérablement les caractéristiques des nouvelles matrices. L'alignement des nanofibres est possible mais entraîne la réduction du diamètre des fibres, de la taille moyenne des pores mais également l'épaisseur des patches.

Des tests de biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés mais ont donné des résultats non concluant. En effet, les matrices alignées de collagène sont trop fines pour supporter l'installation dans un Cell Crown® et résister à la pression exercée par le milieu de culture. Les patches sont également trop fins pour résister à la greffe et aux sutures. Cette étude a montré que l'alignement des nanofibres de collagène est possible mais nécessite encore des adaptations notamment concernant l'épaisseur des matrices obtenues. Ces travaux se poursuivent toujours au laboratoire.

11. Association des matrices de collagène avec un support micropatterné

L'obtention des matrices en nanofibres alignées a montré des résultats prometteurs mais nécessitant encore des étapes de développement. Une autre manière d'améliorer les matrices de collagène est de les associer à des supports ayant des motifs répétés (ou pattern). De nombreuses études ont montré que l'utilisation de motifs peut avoir une influence sur la différenciation des cellules mais également leur maturation (Salick et al. 2014).

L'équipe du Dr. Yong Chen à l'Ecole Normale Supérieure qui travaille actuellement sur le développement de matrice micropatternée nous a proposé d'associer aux matrices de collagène électrospinné un support en polyéthylène glycol

(ou PEG) avec des motifs circulaires. Dans cette étude préliminaire, le polyéthylène glycol a été utilisé afin de vérifier la compatibilité avec les nanofibres de collagène mais également d'analyser le comportement des cardiomyocytes de rats nouveau-nés.

Pour cela, dans un premier temps le support en PEG est obtenu en coulant une solution de PEG dans un moule pré-formé en motifs circulaires. Après séchage, le moule est enlevé et le support en PEG est placé dans le système à électrospinning. Le PEG va alors être utilisé comme collecteur des nanofibres de collagène. Le biomatériau composite ainsi formé comportera donc en surface une couche fine de nanofibres de collagène et en profondeur un support en PEG en pattern circulaire (*Figure 68*) (*A et B*). Les cardiomyocytes de rats nouveau-nés ont ensuite étéensemencées sur le biomatériau composite (*C*) et cultivées pendant 3 jours (*D*) et 7 jours (*E et F*). Après 3 et 7 jours, différents immunomarquages ont été réalisés afin d'étudier la morphologie cellulaire (alpha-actinine), la prolifération (Ki67) et la localisation des cellules au sein des différentes matrices (noyaux marqués au Hoescht).

Après 3 jours de culture sur les biomatériaux composites, les cardiomyocytes se sont étalées sur les nanofibres de collagène et présentent des structures sarcomériques normales. Aucune cellule n'est présente dans les patterns. Cependant après 7 jours de culture, des cellules sont encore majoritairement présentes sur les matrices de collagène mais de nombreuses cellules ont migré à travers les nanofibres et se sont regroupées en cluster dans les patterns circulaires. Le nombre de cellules en prolifération est également très important. La colonisation des biomatériaux composites a donc été possible. Au sein des patterns, les cellules qui ont migré ont conservé une morphologie très arrondie. Cette morphologie est caractéristique des cellules qui n'adhèrent pas sur le support. Le support en PEG semble donc être un support peu adéquat pour les cardiomyocytes.

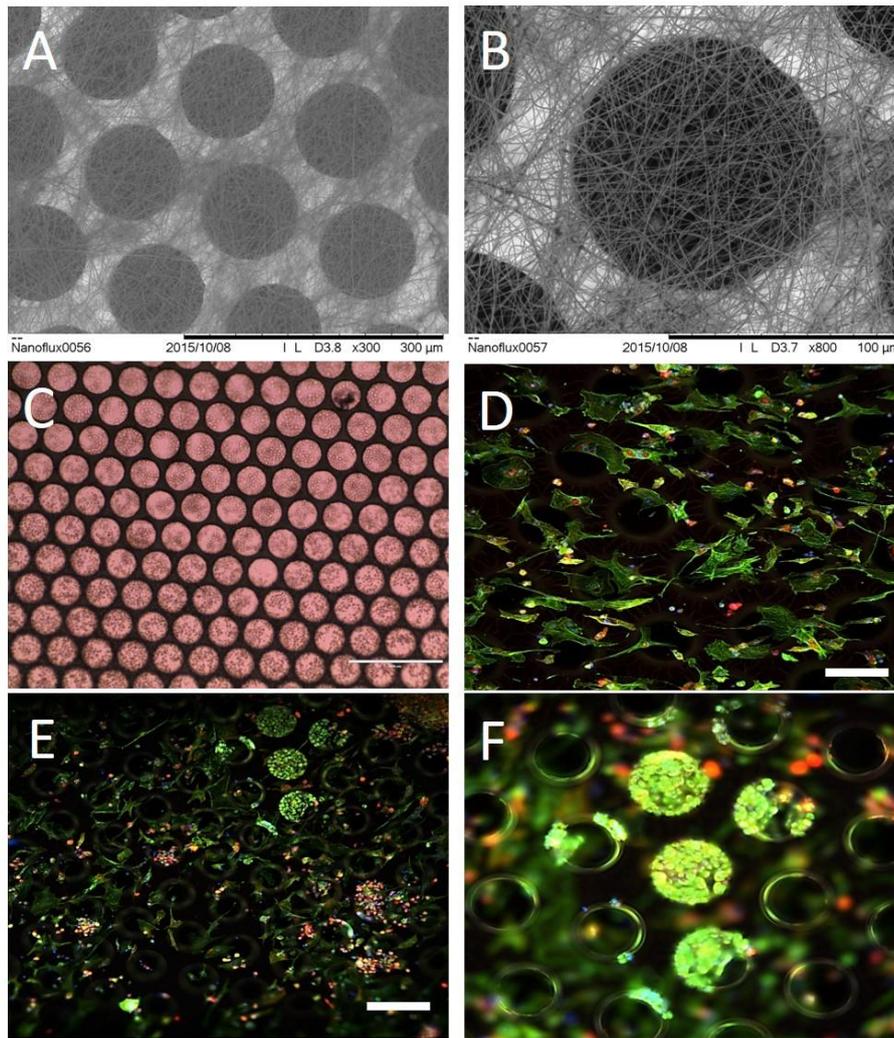


Figure 68 : Culture des cardiomyocytes de rats nouveau-nés sur des matrices de collagène électrospinnées associées à un support en PEG micropatterné. A et B) Images obtenues par Nanoflux PTE LTD, (Singapore) des matrices de collagène associées à un support en PEG avec un motif circulaire. C) Culture des cardiomyocytes de rats nouveau-nés après ensemencement (EVOS, Life Technologies). D à F) Immunomarquages alpha-actine (vert), Ki67 (rouge) et noyaux (bleu). Barre d'échelle : A) 300μm, B) 100μm, C) 400μm, E) 100μm ; D et F) 50μm.

Cette étude préliminaire réalisée à partir des matrices de collagène a permis de montrer la viabilité des biomatériaux composites mais également la colonisation par les cardiomyocytes de rats nouveau-nés à partir de 7 jours de culture. Afin d'améliorer la biocompatibilité et la maturation des cellules cardiaques présentes au niveau des patterns, un support en hydrogel de collagène sera par la suite produit. L'objectif final est d'utiliser les matrices de collagène comme base pour le développement d'un micro tissu pour des utilisations *in vivo* pour l'implantation chez l'animal mais également *in vitro* pour le test de molécules ou de drogues, l'étude de maladies cardiaques mais également l'amélioration de la maturation des cardiomyocytes.

Conclusion

La cardiomyopathie dilatée non-ischémique est caractérisée par la perte du nombre de cardiomyocytes (pouvant être d'origine génétique, environnemental, ou idiopathique) causant la chute de la contractilité du myocarde (Hershberger, Morales, et Siegfried 2010) et un remodelage cardiaque compensatoire qui va aboutir à une insuffisance cardiaque (Koren et al. 1991). L'objectif principal de cette étude était d'apporter au cœur dilaté de nouvelles cellules permettant une régénération tissulaire et un retour à une contractilité convenable. Pour cela, une approche non invasive basée sur des matrices mimant le tissu cardiaque afin d'améliorer la survie des cellules greffées a été développée. Le collagène a été choisi car il représente la protéine majoritaire de la matrice extra-cellulaire, est capable d'interagir avec tous les types cellulaires, possède une très faible immunogénécité, est impliqué dans le remodelage tissulaire, et permet la transmission des signaux mécaniques et électriques. C'est pour toutes ces raisons que nous avons sélectionné le collagène en tant que matériau de base pour les patchs. La technique d'électrospinning a été utilisée car elle permet de générer des matrices nanofibreuses poreuses proches des caractéristiques de la matrice extracellulaire (Sell et al. 2009). Après avoir défini les paramètres de l'électrospinning répondant aux critères déterminés, notamment celui de l'innocuité des produits de préparation des patchs en vue d'une utilisation clinique, nous avons testé différentes matrices obtenues par différents pourcentages d'acide citrique et différents temps de chauffe pour le pontage des nanofibres. La taille des fibres ainsi que la porosité, l'élasticité et la dégradation du collagène ont été évaluées (*Figure 41*, *Figure 42* et *Figure 43*). L'évaluation de la biocompatibilité *in vivo* en greffant les patchs sans cellules sur des souris saines a permis de mettre en évidence la faisabilité de la greffe, la bonne réaction du myocarde en induisant une vascularisation avec une faible réponse immunitaire ainsi qu'une absence d'effet délétère sur la fonction contractile (*Figure 50*, *Figure 51* et *Figure 52*). L'évaluation de la biocompatibilité *in vitro* a également permis d'étudier la viabilité des cardiomyocytes de rats-nouveaux nés cultivées directement sur les matrices de collagène (*Figure 53*). L'ensemble de ces premières données ont permis de sélectionner les patchs préparés avec 10% d'acide citrique et chauffés à 150°C pendant 150 minutes.

Le protocole de différenciation GiWi basé sur une activation/inactivation de la voie Wnt a permis l'obtention d'environ 70% de cellules cardiaques battantes dérivés des cellules souches pluripotentes induites (*Figure 55*). Différentes études ont montré que ces cellules pouvaient être injectées avec succès dans le myocarde et persistaient plusieurs mois dans le myocarde infarci murin (Fernandes et al. 2010). Cependant ces cellules ne permettaient pas une amélioration fonctionnelle dans le modèle d'infarctus chez le rat. Une étude de la même équipe chez le primate a démontré que ces cellules étaient couplées de manière électromécanique aux cellules de l'hôte dans un modèle d'infarctus (Chong et al. 2014). Cependant cette étude a également démontré les limitations de l'utilisation de l'injection suite à l'apparition d'arythmies chez les sujets

traités. La greffe de ces cellules sous forme de feuilles de cellules a également permis le rétablissement fonctionnel et électrique de cœurs infarcis (Higuchi et al. 2015). Cependant, notre expérience des feuilles de cellules nous a permis d'identifier les problèmes potentiels liés à leur fragilité et à la difficulté de manipulation de ces biomatériaux (Hamdi et al. 2013) (*chapitre 1*). C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser les patches de collagène comme transporteur des cellules cardiaques mettant en avant une plus grande facilité de suturabilité, de maniabilité, et avec des propriétés mécaniques proches de celles du myocarde. Cette approche, différente de l'injection intra-myocardique, nous semble être un bon compromis pour l'apport de cellules au myocarde.

Les cellules hiPS-CM cultivées sur les matrices de collagène présentent une structure sarcomérique normale et sont capables de contracter après 48H de culture ce qui permet de suggérer que les cellules sont viables et fonctionnelles sur les patches (*Figure 57*). L'implantation des patches de collagène 10%CA et 150 min de chauffeensemencées avec les hiPS-CM chez les souris α MHC-MerCreMer:Sf/Sf a permis de montrer que 14 jours après l'implantation, non seulement les patches sont encore présents, mais de plus on observe une stabilisation de la fonction cardiaque voire même de manière non-significative une légère récupération de la fonction contractile avec une augmentation de l'expression de l'actine cardiaque et une réduction du marqueur d'insuffisance cardiaque β -MHC, en comparaison des animaux greffés avec un patch sans cellules (*Figure 58*). Cependant aucune cellule n'a été retrouvée après 14 jours de greffe. Une amélioration des matrices de collagène par l'utilisation d'un hydrogel de fibrine protecteur a permis d'améliorer la capacité de rétention des cellules (*Figure 65*).

Malgré l'absence de cellules visibles après 14 jours de greffe, une amélioration de la fonction contractile des animaux implantés avec les matrices cellularisées a été observée. En analysant les cœurs greffés, une amélioration de la vascularisation ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène Serum Response Factor sont observées chez les souris α MHC-MerCreMerSfSf qui possèdent, au cours de cette expérience, une inactivation conditionnelle du gène SRF (*Figure 60*).

Au-delà de la simple fonction d'approvisionnement en cellules réparatrices, les matrices en nanofibres peuvent également être utilisées en tant que support mécanique limitant ainsi le remodelage délétère du ventricule gauche (Kochupura et al. 2005). En effet, en implantant les matrices cellularisées, on a observé une différence de réaction du myocarde vis-à-vis du patch implanté (*Figure 61*). Après l'implantation de biomatériau acellulaire, des cellules interstitielles sont présentes entre le myocarde et le patch, ce qui est une réaction tout à fait normale de réponse à un corps étranger sans rejet immunitaire important (Londono et Badylak 2015). En revanche, après la greffe des patches cellularisés avec les hiPS-CM, aucune cellule interstitielle n'est observable ; en revanche la présence d'une zone fibreuse est détectable au niveau de la jonction patch/myocarde. L'analyse de l'expression de

différents gènes liés à la régulation de la matrice extracellulaire cardiaque ainsi que l'activité des métalloprotéases a permis d'établir un lien avec l'induction du processus de remodelage bénéfique de l'ensemble du cœur par l'implantation des matrices de collagène + hiPS-CM (*Figure 61, Figure 62*). L'ensemble de ces informations suggère que les matrices de collagène associées aux hiPS-CM peuvent permettre une stabilisation de la CMD en activant de manière paracrine les voies de réparation cardiaque endogènes à travers une activation de l'angiogénèse et des protéines de modulation de la matrice extracellulaire cardiaque. Les cellules hiPS-CM semblent potentialiser les effets des matrices de collagène. Cette étude est une preuve de concept que l'utilisation de biomatériaux à base de collagène peut être une stratégie thérapeutique efficace pour les patients ayant un stade avancé de cardiomyopathie dilatée.

Discussion et perspectives

Le principal résultat de cette étude sur le développement des matrices de collagène supportant les hiPS-CM est que la greffe épocardique induit une amélioration de la fonction cardiaque des souris atteintes de cardiomyopathies dilatées non-ischémiques. Les matrices ont une bonne adhérence au myocarde de l'hôte cependant les cellules n'ont pas été initialement détectées après 14 jours de greffe suggérant une action paracrine. Les cellules ont donc activé les voies de signalisation de réparation endogène du cœur via une activation de la vascularisation et une induction du remodelage de la matrice extracellulaire de l'ensemble du cœur.

Contrairement aux maladies cardiaques d'origine ischémiques comme l'infarctus du myocarde, les cardiomyopathies dilatées (ou CMD) ne se prêtent pas aux procédures palliatives comme la revascularisation coronarienne ou la réparation de la valve mitrale. Actuellement le besoin d'une transplantation cardiaque liée à la CMD a dépassé celui des maladies coronariennes (55 % contre 36 %) selon le dernier rapport de la société internationale pour la transplantation cardiaque et pulmonaire (Lund et al. 2014). Il y a donc une nécessité de s'investir dans le développement de nouvelles thérapies, notamment dans l'utilisation des cellules souches qui semble être une approche très prometteuse. Même si la thérapie cellulaire propose de remplacer le tissu cardiaque dans les maladies touchant l'ensemble du cœur avec de nouveaux cardiomyocytes, elle pourrait être encore plus efficace en exploitant les voies de réparation endogène et en atténuant le remodelage délétère par l'augmentation de l'angiogenèse ou par l'activation des cellules souches résidentes du cœur (Garbern et Lee 2013). De plus, les injections intra-myocardiques couramment utilisées pour apporter les cellules au cœur ne semblent pas être la meilleure méthode pour cette maladie car la nature diffuse de la CMD impliquerait un nombre d'injections très élevé et augmenterait le risque de lésion majeure du myocarde malade. C'est pourquoi un traitement plus global en utilisant une matrice chargée avec des cellules d'intérêt permettrait de traiter de manière générale toute la surface cardiaque en réduisant le risque de perforation de la paroi cardiaque. Au-delà de l'apport en cellules réparatrices, la reconstruction tissulaire utilisant des patchs cardiaques peut également apporter un soutien mécanique au myocarde affiné par la perte importante de cardiomyocytes limitant ainsi l'évolution du remodelage délétère (Kochupura et al. 2005). Le rassemblement de ces informations a permis l'émergence du projet visant à développer et évaluer les patchs de collagène cellularisés avec les hiPS-CM.

De nombreuses matrices en polymères naturels et synthétiques ont été testées pour la reconstruction tissulaire cardiaque. Le collagène possède de nombreux avantages. La matrice extracellulaire myocardique est composée essentiellement de collagène de type I et III fibrillé dont l'organisation intracellulaire contribue largement à préserver une microarchitecture cardiaque ainsi que qu'une géométrie ventriculaire adéquates.

Plusieurs études ont montré que l'architecture des fibres de collagène présentes dans le myocarde, en particulier dans l'endomysium, participent à la régulation de l'activité mécanique du cœur (Zimmerman et al. 2000 ; Macchiarelli et al. 2002). En outre, le collagène peut interagir avec la plupart des types cellulaires pour améliorer leur adhésion, la survie et la croissance. Enfin, il existe de nombreuses données concernant l'utilisation du collagène pour des applications médicales démontrant sa sécurité d'emploi. Cela favoriserait le passage en clinique des matrices de collagène. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi le collagène comme biomatériau et utilisé l'électrospinning pour générer les matrices en nanofibres biomimétiques pour se rapprocher au maximum des propriétés de la matrice extracellulaire (Sell et al. 2009). Comme lors de notre précédente étude (Kitsara et al. 2015), nous avons pris soin d'utiliser un atelocollagen de grade clinique, qui est plus soluble, moins antigénique et plus biocompatible que le collagène natif ou la gélatine, et l'obtention des matrices repose sur les solvants non toxiques. Il en résulte un taux de dénaturation après électrospinning de 30 %, ce qui est une corrélation avec les précédentes études sur l'effet de la procédure d'électrospinning sur la modification de la conformation du collagène (Jiang et al. 2013). Différentes conditions de pontage des matrices de collagène après électrospinning ont ensuite testées pour moduler la rigidité du collagène. Les meilleures combinaisons ont été obtenues avec acide citrique 10 % et 150 min de chauffe à 150°C avec un module d'élasticité de 10,1 kPa. Le module d'élasticité du tissu cardiaque natif est de l'ordre de 10 à 20 kPa en diastole (Adam J. Engler et al. 2008) tandis que le module d'élasticité des tissus ischémiés, associé à la fibrose, augmente autour de 30 à 50 kPa (Berry et al. 2006 ; Chaturvedi et al. 2010). En outre, Engler et coll. (Adam J. Engler et al. 2008), après isolement de cellules, ont démontré que les cardiomyocytes présentent des sarcomères matures avec battements réguliers sur gels de polyacrylamide de 10 kPa. Sur gels plus mous, les sarcomères sont moins espacés et non organisés alors que sur gels plus rigides, les myocytes contiennent plus de fibres de stress sans sarcomères définis. Ainsi, l'élasticité de la matrice de collagène dans la gamme de valeurs que celles rapportées pour l'optimisation de la régénération des tissus cardiaques, de l'ordre de 10 à 20 kPa (A. J. Engler et al. 2007) a été validée. Après trois jours de culture des cardiomyocytes sur les matrices de collagène, un tissu fonctionnel cardiaque est observable.

Après le choix des paramètres d'obtention des matrices, l'étape suivante a été le choix des cellules qui seront greffées. Bien qu'il n'existe pas encore de consensus quant à l'identité de la cellule « idéale », de nombreuses études suggèrent que la meilleure efficacité thérapeutique est obtenue en utilisant des cellules engagées dans la lignée cardiaque, par rapport aux cellules non cardiaques, notamment les cellules souches mésenchymateuses (Rossini et al. 2011). L'utilisation des cellules dérivées en cardiomyocytes a donné de meilleurs résultats concernant différents paramètres (la greffe de cellules, réduction de la taille des infarctus et de la fibrose, amélioration de l'angiogenèse et de la fonction et réduction des arythmies) et entraîne une induction plus forte et un tissu spécifique des effets paracrines (Li et al. 2012). C'est pour

l'ensemble de ces raisons que nous avons choisi de travailler avec des cardiomyocytes dérivés des hiPS qui se rapprochent le plus des cardiomyocytes natifs d'un point de vue moléculaire, électrophysiologique et fonctionnel. Au cours des années précédentes, d'importantes améliorations ont été apportées concernant la production d'hiPS-CM en imitant *in vitro*, les voies de signalisation du développement normal durant la cardiogénèse embryonnaire (Gerbin et Murry 2015) et, dans l'étude actuelle, une différenciation cardiomyogénique efficace des cellules pluripotentes est obtenue par une activation/inhibition séquentielle de la voie de signalisation Wnt. Les injections intramyocardiques de ces cellules ont donné des greffes stables (Fernandes et al. 2010), électriquement intégrées (Tian et al. 2009) et vascularisées (Chong et al. 2014). La transplantation de ces cellules sous la forme de feuilles de cellules a également permis une récupération fonctionnelle et électrique des cœurs infarctés (Higuchi et al. 2015). Dans notre étude, les patches de collagène associés aux hiPS-CM ont été greffés dans un modèle de souris double-transgénique (α MHC-MerCreMerSfSf) dans lequel le gène SRF est inactivé spécifiquement dans les cardiomyocytes sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde alpha de la myosine spécifique des cardiomyocytes (α MHC) par induction de la recombinase Cre après injection de tamoxifène. Les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine SRF diminuent drastiquement après l'injection de tamoxifène et les souris présentent une altération progressive de la contractilité cardiaque, une dilatation cardiaque évoluant en une insuffisance cardiaque et la mort dans les 10 semaines (Parlakian et al. 2005 ; Diguet et al. 2011). Les résultats démontrent clairement l'efficacité de la matrice de collagène cellularisée pour la stabilisation de la fonction contractile des souris transgéniques déficientes en SRF. En effet, deux semaines après l'implantation des patches, les volumes ventriculaires ainsi que la fraction d'éjection ont été significativement améliorés chez les souris traitées par rapport aux souris traitées avec les patches contrôle sans cellules. Cette amélioration fonctionnelle est accompagnée d'une diminution significative de bêta MHC par PCR quantitative qui est un marqueur de l'insuffisance cardiaque. Toutefois, au moment où l'analyse de la fonction a été réalisée, les cellules greffées n'étaient plus détectables. Cette information a été signalée à plusieurs reprises dans la littérature et la perte des cellules est maintenant attribuée à de multiples facteurs dont, notamment, une réponse immunitaire liée à la xéno greffe et ce malgré un traitement cyclosporine. L'incapacité d'expliquer les avantages fonctionnels liés à la greffe des cellules souches a donné lieu à l'hypothèse d'effets paracrines dans lesquels différentes biomolécules, libérées par les cellules, favoriseraient l'activation des voies de réparation endogène du cœur. L'augmentation de l'expression de SRF dans les cœurs de souris traitées pourrait refléter une augmentation des voies paracrines qui modulent l'activité et le comportement des cellules endothéliales endogènes, ce qui serait corrélé aux résultats observés concernant la présence d'une plus grande densité capillaire dans les matrices de collagène et, dans une moindre mesure, dans le myocarde à proximité des patches. Il est vrai, cependant, que la hausse de la vascularisation pourrait être également due

au collagène, lui-même, qui est connu pour avoir des propriétés intrinsèques angiogéniques (Twardowski et al. 2007). Enfin, les matrices de collagène cellularisées sont associées à la stimulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du remodelage de la matrice extracellulaire. En particulier, l'ostéopontine a été décrite comme un régulateur important des métalloprotéinases matricielles et leurs inhibiteurs tissulaires au cours de la régénération tissulaire, ce qui entraîne une diminution importante de la dilatation du ventricule gauche après infarctus du myocarde (Krishnamurthy et al. 2009). En lien avec cette observation, l'augmentation de l'expression de l'ostéopontine dans le groupe traité est corrélée avec les taux d'ARNm des inhibiteurs de métalloprotéinases (Timp-1). Il faut noter que l'expression de ces gènes a été mesurée à partir de morceaux de l'apex cardiaque, une zone éloignée de la zone d'implantation des matrices, ce qui peut avoir conduit à sous-estimer leur niveau d'expression mais permet de démontrer la libération de molécules à partir du patch vers l'ensemble du myocarde cardiaque. Un mécanisme alternatif par lequel les matrices associées aux hiPS-CM permettraient une amélioration de la fonction ventriculaire gauche par un effet cardioprotecteur associé à la présence de la réponse immunitaire xénogénique (induit par la présence de cellules humaines implantées dans un cœur murin) est également possible (Al-Daccak et Charron 2015). L'effet sur la fonction cardiaque serait, dans ce cas-là, différent si les matrices associées aux hiPS-CM étaient implantées chez l'homme. Des études précédentes publiées dans le domaine permettent d'apporter plusieurs éléments de réponse :

(1) Dans un modèle de souris immunodéficiences où aucun rejet ne devrait se produire, la transplantation de cellules progénitrices dérivées des cellules souches pluripotentes humaines a montré un effet sur la préservation de la fonction myocardique post-infarctus tandis que les fibroblastes, également d'origine humaine, n'ont pas eu d'effet (Ye et al. 2015).

(2) Dans un modèle de souris immunocompétentes, la transplantation de fibroblastes humains n'a montré aucun avantage fonctionnel malgré la réponse immunitaire attendue dans ce contexte xénogénique (Kolossoff et al. 2006).

(3) Une étude antérieure dans notre laboratoire a montré quelques avantages fonctionnels de la transplantation de cellules de souches adipeuses allogéniques (Hamdi et al. 2013) tandis que dans le même modèle de CMD, la transplantation de myoblastes squelettiques humains a également permis d'améliorer la fonction cardiaque (chapitre 1).

(4) Au cours de l'étude concernant les matrices de collagène, les immunomarquages ainsi que les PCR quantitatives n'ont pas montré une différence notable concernant le nombre de macrophages ni l'infiltration des lymphocytes T, ce qui démontre l'efficacité de l'immunosuppression par la cyclosporine dans l'atténuation de la réponse immunitaire xénogénique. Ces données suggèrent que les avantages fonctionnels des matrices de collagène supportant les hiPS-CM pourraient être expliqués par une réponse immunitaire non spécifique, et que la présence, au moins

au début, des cardiomyocytes dérivés des hiPS, a directement contribué à l'amélioration des analyses.

Au final, les résultats convergent vers un avantage fonctionnel des patchs en nanofibres de collagène électrospinnés chargés avec les hiPS-CM à travers l'activation paracrine des voies de réparation cardiaque endogène. L'ensemble de l'étude sur les matrices de collagène supporte l'idée que recouvrir le ventricule gauche dilaté non-ischémique par une matrice cellularisée dotée de propriétés cardiomyogéniques pourrait être un moyen efficace de stabiliser la pathologie afin de retarder au maximum l'évolution du processus de remodelage par lequel un remplacement cardiaque complet deviendrait inévitable.

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. Ainsi, concernant l'amélioration des matrices de collagène, les voies paracrines activées par l'implantation des matrices de collagène doivent encore être caractérisées avec précision. Une implantation des matrices dans un modèle animal cliniquement pertinent de grand gabarit pourrait également être menée afin de confirmer ces résultats. Cependant les principales améliorations du patch de collagène semblent être les voies les plus prometteuses. Ainsi, l'association de la fibrine avec les matrices de collagène montre des résultats préliminaires très encourageants, cependant l'étude du temps de survie des cellules greffées restent à approfondir. Une comparaison des réponses fonctionnelles de ces matrices de collagène dont les cellules hiPS-CM seraient présentes plus longtemps après l'implantation chez l'animal doit également être réalisée. Les résultats sur l'utilisation d'un hydrogel micropatterné qui serait placé en dessous des matrices de collagène sont encore préliminaires (Figure 68) et ne permettent pas de conclure. En revanche l'association des matrices électrospinnées avec un hydrogel micropatterné pourrait constituer un support intéressant pour la construction finale d'un micro-tissu cardiaque *in vitro*. Ce type de micro-tissu serait intéressant pour l'étude de la maturation des hiPS-CM, de différentes pathologies cardiaques ou tester l'effet de différentes biomolécules sur un tissu biomimétique cardiaque.

Bibliographie du Chapitre 2

- Ackerman, M. S., M. Bhate, N. Shenoy, K. Beck, J. A. Ramshaw, et B. Brodsky. 1999. « Sequence Dependence of the Folding of Collagen-like Peptides. Single Amino Acids Affect the Rate of Triple-Helix Nucleation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7668-73.
- Al-Daccak, R., et D. Charron. 2015. « Allogenic Benefit in Stem Cell Therapy: Cardiac Repair and Regeneration ». *Tissue Antigens* 86 (3): 155-62. doi:10.1111/tan.12614.
- Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschläger, U. Rüther, et A. Nordheim. 1998. « Serum Response Factor Is Essential for Mesoderm Formation during Mouse Embryogenesis ». *The EMBO Journal* 17 (21): 6289-99. doi:10.1093/emboj/17.21.6289.
- Batalov, Ivan, et Adam W. Feinberg. 2015. « Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture ». *Biomarker Insights* 10 (Suppl 1): 71-76. doi:10.4137/BMI.S20050.
- Bellamy, Valérie, Valérie Vanneau, Alain Bel, Hany Nemetalla, Solène Emmanuelle Boitard, Yohan Farouz, Pierre Joanne, et al. 2015. « Long-Term Functional Benefits of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Embedded into a Fibrin Scaffold ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 34 (9): 1198-1207. doi:10.1016/j.healun.2014.10.008.
- Berry, Mark F., Adam J. Engler, Y. Joseph Woo, Timothy J. Pirolli, Lawrence T. Bish, Vasant Jayasankar, Kevin J. Morine, Timothy J. Gardner, Dennis E. Discher, et H. Lee Sweeney. 2006. « Mesenchymal Stem Cell Injection after Myocardial Infarction Improves Myocardial Compliance ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 290 (6): H2196-2203. doi:10.1152/ajpheart.01017.2005.
- Bozec, Laurent, et Marianne Odlyha. 2011. « Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy ». *Biophysical Journal* 101 (1): 228-36. doi:10.1016/j.bpj.2011.04.033.
- Burridge, Paul W., Elena Matsa, Praveen Shukla, Ziliang C. Lin, Jared M. Churko, Antje D. Ebert, Feng Lan, et al. 2014. « Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes ». *Nature Methods* 11 (8): 855-60. doi:10.1038/nmeth.2999.
- Cao, Nan, He Liang, Jijun Huang, Jia Wang, Yixiong Chen, Zhongyan Chen, et Huang-Tian Yang. 2013. « Highly Efficient Induction and Long-Term Maintenance of Multipotent Cardiovascular Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells under Defined Conditions ». *Cell Research* 23 (9): 1119-32. doi:10.1038/cr.2013.102.
- Castellano, Delia, María Blanes, Bruno Marco, Inmaculada Cerrada, Amparo Ruiz-Saurí, Beatriz Pelacho, Miriam Araña, et al. 2014. « A Comparison of Electrospun Polymers Reveals poly(3-Hydroxybutyrate) Fiber as a Superior Scaffold for Cardiac Repair ». *Stem Cells and Development* 23 (13): 1479-90. doi:10.1089/scd.2013.0578.
- Chaturvedi, Rajiv R., Todd Herron, Robert Simmons, Darryl Shore, Pankaj Kumar, Babulal Sethia, Felix Chua, Efsthios Vassiliadis, et Jonathan C. Kentish. 2010. « Passive Stiffness of Myocardium from Congenital Heart Disease and Implications for Diastole ». *Circulation* 121 (8): 979-88. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.850677.
- Chong, James J. H., Xiulan Yang, Creighton W. Don, Elina Minami, Yen-Wen Liu, Jill J. Weyers, William M. Mahoney, et al. 2014. « Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts ». *Nature* 510 (7504): 273-77. doi:10.1038/nature13233.
- Corda, S., J. L. Samuel, et L. Rappaport. 2000. « Extracellular Matrix and Growth Factors during Heart Growth ». *Heart Failure Reviews* 5 (2): 119-30. doi:10.1023/A:1009806403194.
- Couade, Mathieu, Mathieu Pernot, Claire Prada, Emmanuel Messas, Joseph Emmerich, Patrick Bruneval, Aline Criton, Mathias Fink, et Mickael Tanter. 2010. « Quantitative Assessment of Arterial Wall Biomechanical Properties Using Shear Wave Imaging ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 36 (10): 1662-76. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.004.
- Dai, Wangde, Sharon L. Hale, Gregory L. Kay, Aarne J. Jyrala, et Robert A. Kloner. 2009. « Delivering Stem Cells to the Heart in a Collagen Matrix Reduces Relocation of Cells to Other Organs as Assessed by Nanoparticle Technology ». *Regenerative Medicine* 4 (3): 387-95. doi:10.2217/rme.09.2.
- Diguet, Nicolas, Youssef Mallat, Romain Ladouce, Gilles Clodic, Alexandre Prola, Eva Tritsch, Jocelyne Blanc, et al. 2011. « Muscle Creatine Kinase Deficiency Triggers Both Actin Depolymerization and Desmin Disorganization by Advanced Glycation End Products in Dilated Cardiomyopathy ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (40): 35007-19. doi:10.1074/jbc.M111.252395.
- Dong, Bin, Olivier Arnoult, Meghan E. Smith, et Gary E. Wnek. 2009. « Electrospinning of Collagen Nanofiber Scaffolds from Benign Solvents ». *Macromolecular Rapid Communications* 30 (7): 539-42. doi:10.1002/marc.200800634.

- Engler, A. J., H. L. Sweeney, D. E. Discher, et J. E. Schwarzbauer. 2007. « Extracellular Matrix Elasticity Directs Stem Cell Differentiation ». *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 7 (4): 335.
- Engler, Adam J., Christine Carag-Krieger, Colin P. Johnson, Matthew Raab, Hsin-Yao Tang, David W. Speicher, Joseph W. Sanger, Jean M. Sanger, et Dennis E. Discher. 2008. « Embryonic Cardiomyocytes Beat Best on a Matrix with Heart-like Elasticity: Scar-like Rigidity Inhibits Beating ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 22): 3794-3802. doi:10.1242/jcs.029678.
- Fernandes, S., A. V. Naumova, W. Z. Zhu, M. A. Laflamme, J. Gold, et C. E. Murry. 2010. « Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Engraft but Do Not Alter Cardiac Remodeling after Chronic Infarction in Rats ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (6): 941-49. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.09.008.
- Frangogiannis, Nikolaos G. 2012. « Matricellular Proteins in Cardiac Adaptation and Disease ». *Physiological Reviews* 92 (2): 635-88. doi:10.1152/physrev.00008.2011.
- Garbern, Jessica C., et Richard T. Lee. 2013. « Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration ». *Cell Stem Cell* 12 (6): 689-98. doi:10.1016/j.stem.2013.05.008.
- Gerbin, Kaytlyn A., et Charles E. Murry. 2015. « The Winding Road to Regenerating the Human Heart ». *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 24 (3): 133-40. doi:10.1016/j.carpath.2015.02.004.
- Hamdi, Hadhami, Solène Emmanuelle Boitard, Valérie Planat-Benard, Julia Pouly, Hany Neamatalla, Pierre Joanne, Marie-Cécile Perier, et al. 2013. « Efficacy of Epicardially Delivered Adipose Stroma Cell Sheets in Dilated Cardiomyopathy ». *Cardiovascular Research* 99 (4): 640-47. doi:10.1093/cvr/cvt149.
- Hershberger, Ray E., Ana Morales, et Jill D. Siegfried. 2010. « Clinical and Genetic Issues in Dilated Cardiomyopathy: A Review for Genetics Professionals ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 12 (11): 655-67. doi:10.1097/GIM.0b013e3181f2481f.
- Higuchi, Takahiro, Shigeru Miyagawa, James T. Pearson, Satsuki Fukushima, Atsuhiko Saito, Hirotsugu Tsuchimochi, Takashi Sonobe, et al. 2015. « Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart ». *Cell Transplantation* 24 (12): 2479-89. doi:10.3727/096368914X685799.
- Huang, Gloria Portocarrero, Shobana Shanmugasundaram, Pallavi Masih, Deep Pandya, Suwah Amara, George Collins, et Treena Livingston Arinze. 2015. « An Investigation of Common Crosslinking Agents on the Stability of Electrospun Collagen Scaffolds ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 103 (2): 762-71. doi:10.1002/jbm.a.35222.
- Jalil, J. E., C. W. Doering, J. S. Janicki, R. Pick, S. G. Shroff, et K. T. Weber. 1989. « Fibrillar Collagen and Myocardial Stiffness in the Intact Hypertrophied Rat Left Ventricle ». *Circulation Research* 64 (6): 1041-50.
- Jiang, Qiuran, Narendra Reddy, Simeng Zhang, Nicholas Roscioli, et Yiqi Yang. 2013. « Water-Stable Electrospun Collagen Fibers from a Non-Toxic Solvent and Crosslinking System ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 101 (5): 1237-47. doi:10.1002/jbm.a.34422.
- Kadler, K. E., D. F. Holmes, J. A. Trotter, et J. A. Chapman. 1996. « Collagen Fibril Formation ». *The Biochemical Journal* 316 (Pt 1) (mai): 1-11.
- Kassiri, Zamaneh, et Rama Khokha. 2005. « Myocardial Extra-Cellular Matrix and Its Regulation by Metalloproteinases and Their Inhibitors ». *Thrombosis and Haemostasis* 93 (2): 212-19. doi:10.1160/TH04-08-0522.
- Keller, G. M. 1995. « In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Current Opinion in Cell Biology* 7 (6): 862-69.
- Kitsara, Maria, Pierre Joanne, Solène Emmanuelle Boitard, Ibtihel Ben Dhiab, Barbara Poinard, Philippe Menasché, Christian Gagnieu, Patricia Forest, Onnik Agbulut, et Yong Chen. 2015. « Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers ». *Microelectronic Engineering, Micro/Nano Biotechnologies & Systems* 2014, 144 (août): 46-50. doi:10.1016/j.mee.2015.02.034.
- Kochupura, Paul V., Evren U. Azeloglu, Damon J. Kelly, Sergey V. Doronin, Stephen F. Badylak, Irvin B. Krukenkamp, Ira S. Cohen, et Glenn R. Gaudette. 2005. « Tissue-Engineered Myocardial Patch Derived from Extracellular Matrix Provides Regional Mechanical Function ». *Circulation* 112 (9 Suppl): I144-149. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524355.
- Kolossov, Eugen, Toktam Bostani, Wilhelm Roell, Martin Breitbach, Frank Pillekamp, Jens M. Nygren, Philipp Sasse, et al. 2006. « Engraftment of Engineered ES Cell-Derived Cardiomyocytes but Not BM Cells Restores Contractile Function to the Infarcted Myocardium ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (10): 2315-27. doi:10.1084/jem.20061469.
- Koren, M. J., R. B. Devereux, P. N. Casale, D. D. Savage, et J. H. Laragh. 1991. « Relation of Left Ventricular Mass and Geometry to Morbidity and Mortality in Uncomplicated Essential Hypertension ». *Annals of Internal Medicine* 114 (5): 345-52.

- Krishnamurthy, Prasanna, J. Thomas Peterson, Venkateswaran Subramanian, Mahipal Singh, et Krishna Singh. 2009. « Inhibition of Matrix Metalloproteinases Improves Left Ventricular Function in Mice Lacking Osteopontin after Myocardial Infarction ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 322 (1-2): 53-62. doi:10.1007/s11010-008-9939-6.
- Laflamme, Michael A., Kent Y. Chen, Anna V. Naumova, Veronica Muskheli, James A. Fugate, Sarah K. Dupras, Hans Reinecke, et al. 2007. « Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells in pro-Survival Factors Enhance Function of Infarcted Rat Hearts ». *Nature Biotechnology* 25 (9): 1015-24. doi:10.1038/nbt1327.
- Lamour, Guillaume, Ahmed Hamraoui, Andrii Buvailo, Yangjun Xing, Sean Keuleyan, Vivek Prakash, Ali Eftekhari-Bafrooei, et Eric Borguet. 2010. « Contact Angle Measurements Using a Simplified Experimental Setup ». *Journal of Chemical Education* 87 (12): 1403-7. doi:10.1021/ed100468u.
- Li, Tao-Sheng, Ke Cheng, Konstantinos Malliaras, Rachel Ruckdeschel Smith, Yiqiang Zhang, Baiming Sun, Noriko Matsushita, et al. 2012. « Direct Comparison of Different Stem Cell Types and Subpopulations Reveals Superior Paracrine Potency and Myocardial Repair Efficacy with Cardiosphere-Derived Cells ». *Journal of the American College of Cardiology* 59 (10): 942-53. doi:10.1016/j.jacc.2011.11.029.
- Lian, Xiaojun, Cheston Hsiao, Gisela Wilson, Kexian Zhu, Laurie B. Hazeltine, Samira M. Azarin, Kunil K. Raval, Jianhua Zhang, Timothy J. Kamp, et Sean P. Palecek. 2012. « Robust Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells via Temporal Modulation of Canonical Wnt Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27): E1848-1857. doi:10.1073/pnas.1200250109.
- Londono, Ricardo, et Stephen F. Badylak. 2015. « Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of in Vivo Remodeling ». *Annals of Biomedical Engineering* 43 (3): 577-92. doi:10.1007/s10439-014-1103-8.
- Lund, Lars H., Leah B. Edwards, Anna Y. Kucheryavaya, Christian Benden, Jason D. Christie, Anne I. Dipchand, Fabienne Dobbels, et al. 2014. « The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-First Official Adult Heart Transplant Report--2014; Focus Theme: Retransplantation ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 33 (10): 996-1008. doi:10.1016/j.healun.2014.08.003.
- Lynn, A. K., I. V. Yannas, et W. Bonfield. 2004. « Antigenicity and Immunogenicity of Collagen ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 71 (2): 343-54. doi:10.1002/jbm.b.30096.
- Macchiarelli, G., O. Ohtani, S. A. Nottola, T. Stallone, A. Camboni, I. M. Prado, et P. M. Motta. 2002. « A Micro-Anatomical Model of the Distribution of Myocardial Endomysial Collagen ». *Histology and Histopathology* 17 (3): 699-706.
- Matthews, Jamil A., Gary E. Wnek, David G. Simpson, et Gary L. Bowlin. 2002. « Electrospinning of Collagen Nanofibers ». *Biomacromolecules* 3 (2): 232-38.
- Medugorac, I., et R. Jacob. 1983. « Characterisation of Left Ventricular Collagen in the Rat ». *Cardiovascular Research* 17 (1): 15-21.
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Jean-Roch Fabreguettes, Alain Bel, Lucie Tosca, Sylvie Garcia, Valérie Bellamy, et al. 2015. « Towards a Clinical Use of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors: A Translational Experience ». *European Heart Journal* 36 (12): 743-50. doi:10.1093/eurheartj/ehu192.
- Nakajima, Kazuaki, Jun Fujita, Makoto Matsui, Shugo Tohyama, Noriko Tamura, Hideaki Kanazawa, Tomohisa Seki, et al. 2015. « Gelatin Hydrogel Enhances the Engraftment of Transplanted Cardiomyocytes and Angiogenesis to Ameliorate Cardiac Function after Myocardial Infarction ». *PLoS One* 10 (7): e0133308. doi:10.1371/journal.pone.0133308.
- Nguyen, Duy T., Chunhua Ding, Emily Wilson, Gregory M. Marcus, et Jeffrey E. Olgin. 2010. « Pirfenidone Mitigates Left Ventricular Fibrosis and Dysfunction after Myocardial Infarction and Reduces Arrhythmias ». *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society* 7 (10): 1438-45. doi:10.1016/j.hrthm.2010.04.030.
- Parlakian, Ara, Claude Charvet, Brigitte Escoubet, Mathias Mericskay, Jeffery D. Molkentin, Guillaume Gary-Bobo, Leon J. De Windt, et al. 2005. « Temporally Controlled Onset of Dilated Cardiomyopathy through Disruption of the SRF Gene in Adult Heart ». *Circulation* 112 (19): 2930-39. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.533778.
- Pernot, Mathieu, Mathieu Couade, Philippe Mateo, Bertrand Crozatier, Rodolphe Fischmeister, et Mickaël Tanter. 2011. « Real-Time Assessment of Myocardial Contractility Using Shear Wave Imaging ». *Journal of the American College of Cardiology* 58 (1): 65-72. doi:10.1016/j.jacc.2011.02.042.
- Rajnoch, J., A. Lodererova, A. Szabo, E. Honsova, A. Vannay, S. Bloudickova, I. Matl, et O. Viklicky. 2005. « Regulators of Angiogenesis in Renal Ischemia/reperfusion Injury in Normotensive and Hypertensive

- Rats: Effect of Tacrolimus ». *Transplantation Proceedings* 37 (1): 352-54. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.154.
- Robinson, T. F., S. M. Factor, J. M. Capasso, B. A. Wittenberg, O. O. Blumenfeld, et S. Seifter. 1987. « Morphology, Composition, and Function of Struts between Cardiac Myocytes of Rat and Hamster ». *Cell and Tissue Research* 249 (2): 247-55.
- Rossini, Alessandra, Caterina Frati, Costanza Lagrasta, Gallia Graiani, Alessandro Scopece, Stefano Cavalli, Ezio Musso, et al. 2011. « Human Cardiac and Bone Marrow Stromal Cells Exhibit Distinctive Properties Related to Their Origin ». *Cardiovascular Research* 89 (3): 650-60. doi:10.1093/cvr/cvq290.
- Salick, Max R., Brett N. Napiwocki, Jin Sha, Gavin T. Knight, Shahzad A. Chindhy, Timothy J. Kamp, Randolph S. Ashton, et Wendy C. Crone. 2014. « Micropattern Width Dependent Sarcomere Development in Human ESC-Derived Cardiomyocytes ». *Biomaterials* 35 (15): 4454-64. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.001.
- Schellings, Mark W. M., Davy Vanhoutte, Melissa Swinnen, Jack P. Cleutjens, Jacques Debets, Rick E. W. van Leeuwen, Jan d'Hooge, et al. 2009. « Absence of SPARC Results in Increased Cardiac Rupture and Dysfunction after Acute Myocardial Infarction ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 113-23. doi:10.1084/jem.20081244.
- Sell, Scott A., Michael J. McClure, Koyal Garg, Patricia S. Wolfe, et Gary L. Bowlin. 2009. « Electrospinning of Collagen/biopolymers for Regenerative Medicine and Cardiovascular Tissue Engineering ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (12): 1007-19. doi:10.1016/j.addr.2009.07.012.
- Shin, M., O. Ishii, T. Sueda, et J. P. Vacanti. 2004. « Contractile Cardiac Grafts Using a Novel Nanofibrous Mesh ». *Biomaterials* 25 (17): 3717-23. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.055.
- Somaiah, Chinnapaka, Atul Kumar, Darilang Mawrie, Amit Sharma, Suraj Dasharath Patil, Jina Bhattacharyya, Rajaram Swaminathan, et Bithiah Grace Jaganathan. 2015. « Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells ». *PLoS One* 10 (12): e0145068. doi:10.1371/journal.pone.0145068.
- Spector, David, Zvi Perry, Tracy Konobeck, Daniel Mooradian, et Scott Shikora. 2011. « Comparison of Hemostatic Properties between Collagen and Synthetic Buttress Materials Used in Staple Line Reinforcement in a Swine Splenic Hemorrhage Model ». *Surgical Endoscopy* 25 (4): 1148-52. doi:10.1007/s00464-010-1331-4.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5): 861-72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Tian, Lin, S. Andrew Hires, Tianyi Mao, Daniel Huber, M. Eugenia Chiappe, Sreekanth H. Chalasani, Leopoldo Petreanu, et al. 2009. « Imaging Neural Activity in Worms, Flies and Mice with Improved GCaMP Calcium Indicators ». *Nature Methods* 6 (12): 875-81. doi:10.1038/nmeth.1398.
- Tulloch, Nathaniel L., Veronica Muskheli, Maria V. Razumova, F. Steven Korte, Michael Regnier, Kip D. Hauch, Lil Pabon, Hans Reinecke, et Charles E. Murry. 2011. « Growth of Engineered Human Myocardium with Mechanical Loading and Vascular Coculture ». *Circulation Research* 109 (1): 47-59. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.237206.
- Twardowski, T., A. Fertala, J. P. R. O. Orgel, et J. D. San Antonio. 2007. « Type I Collagen and Collagen Mimetics as Angiogenesis Promoting Superpolymers ». *Current Pharmaceutical Design* 13 (35): 3608-21.
- Ye, Jianqin, Meenakshi Gaur, Yan Zhang, Richard E. Sievers, Brandon J. Woods, Julian Aurigui, Harold S. Bernstein, et Yerem Yeghiazarians. 2015. « Treatment with hESC-Derived Myocardial Precursors Improves Cardiac Function after a Myocardial Infarction ». *PLoS One* 10 (7): e0131123. doi:10.1371/journal.pone.0131123.
- Zimmerman, S. D., W. J. Karlon, J. W. Holmes, J. H. Omens, et J. W. Covell. 2000. « Structural and Mechanical Factors Influencing Infarct Scar Collagen Organization ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278 (1): H194-200.
- Zimmermann, Wolfram-Hubertus, Ivan Melnychenko, Gerald Wasmeier, Michael Didié, Hiroshi Naito, Uwe Nixdorff, Andreas Hess, et al. 2006. « Engineered Heart Tissue Grafts Improve Systolic and Diastolic Function in Infarcted Rat Hearts ». *Nature Medicine* 12 (4): 452-58. doi:10.1038/nm1394.

Chapitre 3 : Etude biologique d'un hydrogel naturel de chitosane acellulaire pour la revascularisation de la zone infarctée pour les cardiopathies ischémiques

Introduction et présentation du projet

L'étude précédente a pour fondement le bio-mimétisme qui consiste à copier le plus fidèlement possible le tissu cardiaque naturel. L'utilisation d'une matrice fibreuse de collagène couplée à des cardiomyocytes fonctionnels dérivés de cellules souches pluripotentes est en effet une stratégie qui implique de reconstruire un micro-tissu cardiaque le plus proche possible de l'original. La principale difficulté d'une stratégie basée sur le bio-mimétisme réside dans la complexité importante des organisations naturelles. Ainsi le tissu cardiaque est autrement plus complexe que les deux composants utilisés dans notre étude. La matrice est constituée de nombreuses autres molécules et protéines, il existe de nombreux types cellulaires et une organisation complexe qui permettent au tissu cardiaque de fonctionner correctement. Ainsi, des approches différentes peuvent être envisagées afin de pallier cette complexité : la bio-inspiration. L'équipe du Pr. Laurent David à Lyon (Ingénierie des Matériaux Polymères - UMR CNRS 5223, Site Université Claude Bernard Lyon 1, Équipe Polymères, matériaux et interface avec les sciences du vivant) conduit des travaux qui s'inscrivent résolument dans cette démarche (Montembault et al. 2006). Cette approche consiste à utiliser une molécule qui possède des propriétés biologiques mais qui reste suffisamment simple d'utilisation pour être massivement utilisée d'un point de vue chimique et industriel. Pour cela, l'équipe du Pr David utilise du chitosane, un polymère naturel obtenu à partir de la chitine, un polysaccharide présent chez de nombreuses espèces animales ou fongiques comme l'exosquelette des crustacés ou l'endosquelette des céphalopodes (le calmar par exemple).

1. Le chitosane

Le chitosane (*Figure 69*) est obtenu par désacétylation de la chitine et possède des liaisons glycosidiques et N-acetyl-glucosamine qui se retrouvent dans la structure des glycosaminoglycanes naturellement présents dans la matrice extracellulaire. Les principales propriétés et applications du chitosane dépendent de son degré d'acétylation qui est la fraction molaire d'unités 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose le long de la chaîne de chitosane. Les hydrogels de chitosane sont principalement composés d'eau (environ 95%) et sont poreux. De plus le chitosane possède de nombreuses propriétés biologiques qui en font un candidat de choix pour une utilisation en ingénierie tissulaire ou en thérapie cellulaire. Ainsi, le chitosane est biodégradable (Vårum et al. 1997), biocompatible (Yuan et al. 2004), non toxique, bioactif (Gorzalanny et al. 2007) et hémostatique (Rao et Sharma 1997). Il a également été montré que le chitosane possède aussi des propriétés antibactériennes et antifongiques (Rabea et al. 2003 ; Kong et al. 2010). De plus, il a déjà été couramment utilisé en chirurgie pour prévenir des adhérences (Zhu, Peng, et Zhang 2015). Enfin, le chitosane possède aussi la capacité d'accélérer la régénération de la peau (Ishihara et al. 2001). De par ses propriétés, ce polysaccharide naturel pourrait donc être très intéressant dans le cadre d'une utilisation en thérapie cardiaque.

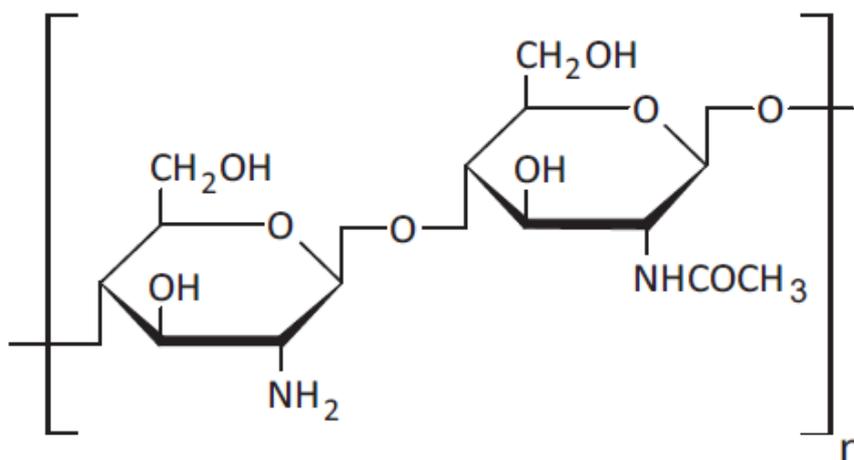


Figure 69 : Représentation de la structure moléculaire du chitosane (groupement 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose à gauche et groupement 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose à droite de la liaison β -(1-4)-glycosidique)

2. Thérapie cellulaire cardiaque et chitosane

Plusieurs études ont démontré l'intérêt d'utiliser ce biomatériau pour la thérapie cellulaire cardiaque. Ainsi, récemment, une équipe a démontré que l'injection d'un hydrogel thermosensible en combinaison avec des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux améliorerait la survie de ces cellules dans le myocarde infarci (Liu et al. 2012) en modulant, notamment, l'activité des espèces réactives de l'oxygène. De la même manière, une combinaison de chitosane et de cellules souches embryonnaires améliorerait la densité de vaisseaux de la zone infarctée et améliore la fonction cardiaque (Lu et al. 2009). Il a également été démontré que l'injection seule de chitosane induisait une augmentation de la densité de capillaires dans la cicatrice fibreuse dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat (Wang et al. 2010). Mais, jusqu'à présent ces approches ont été menées à partir de chitosane injectable thermosensible. Une stratégie basée sur la greffe d'un biomatériau constitué de chitosane reste donc à mener.

3. Présentation du projet

En collaboration avec l'équipe du Pr. David nous avons mené une étude afin de vérifier s'il était possible de greffer un hydrogel naturel de chitosane non cellularisé pour la revascularisation de la zone infarctée pour les cardiopathies ischémiques. L'objectif de ce projet était d'activer l'angiogénèse et de promouvoir la revascularisation de la zone infarctée grâce aux propriétés intrinsèques du chitosane. Le patch de chitosane fabriqué par l'équipe du Pr. David a été greffé sur le cœur dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat adulte. Le projet s'est ainsi déroulé en trois étapes :

- Etape 1 : préparation de l'hydrogel de chitosane
- Etape 2 : caractérisation physico-chimique de l'hydrogel de chitosane
- Etape 3 : greffe et évaluation des effets biologiques de l'hydrogel de chitosane

Je me suis plus particulièrement impliquée dans la troisième et dernière étape de ce projet qui a permis la publication d'un article scientifique : Fiamingo A, Montembault A, Boitard SE, Naemetalla H, Agbulut O, Delair T, Campana-Filho SP, Menasché P, et David L. 2016. « Chitosan Hydrogels for the Regeneration of Infarcted Myocardium : Preparation, Physicochemical Characterization, and Biological Evaluation ». *Biomacromolecules* 17 (5) : 1662-72.

Suite aux implantations de ces patchs chez le rat, le taux de récupération de la fonctionnalité cardiaque a été analysé et une étude histologique des tissus a été également réalisée (formation de néo-vaisseaux, colonisation du biomatériau après la greffe, effet sur le myocarde infarci). L'objectif de cette étude était donc de vérifier la biocompatibilité des patchs mais également d'analyser le rôle des hydrogels de chitosane dans la recouvrance de la fonction cardiaque. Les analyses histologiques permettront de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

Matériel et méthode

1. Préparation des hydrogels physiques de chitosane

Un hydrogel physique est obtenu grâce à la formation de liaisons de faibles énergies et donc réversibles à la différence des liaisons covalentes d'un hydrogel chimique. Ainsi, par exemple le collagène, la gélatine ou l'agarose forment des hydrogels physiques en solution. Le chitosane utilisé dans cette étude se caractérise par un faible degré d'acétylation (2,8%) qui permet de limiter les réactions inflammatoires. Les hydrogels physiques de chitosane ont été obtenus en utilisant deux méthodes de gélification : NaOH aqueux ou NH₃ gazeux (Montembault et al. 2006) (*Figure 70*).

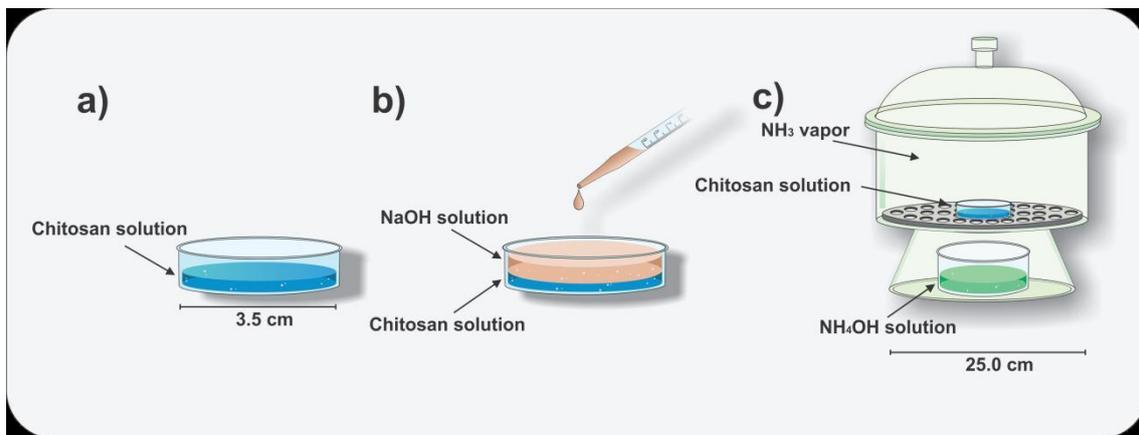


Figure 70 : Processus de fabrication des hydrogels de chitosane.

Les hydrogels, une fois obtenus, sont lavés rigoureusement et stockés dans l'eau. Les hydrogels sont ensuite stérilisés par autoclave en milieu liquide. Tous les détails concernant l'obtention des hydrogels de chitosane sont indiqués dans l'article intégré à ce chapitre. Différentes concentrations initiales de chitosane ont été étudiées (1,5%, 2% et 3,5%) et une nomenclature est utilisée pour identifier les différents hydrogels : Ch-X-Y-St, où X correspond à la concentration du chitosane utilisé et Y à la méthode de gélification (S pour le NaOH aqueux et N le NH₃ gazeux). St indique que l'hydrogel a été stérilisé.

2. Evaluation physico-chimique du chitosane

Différentes analyses physico-chimiques des hydrogels de chitosane ont été menées. Ainsi, des tests de tension et des tests de suturabilité ont été effectués. Les tests de tension permettent de déterminer le module élastique de l'hydrogel (donné en kPa) et l'allongement maximal du patch jusqu'à la rupture (donné en % d'allongement). Le test de suturabilité permet de déterminer la tension maximale supportée par l'hydrogel au moment de la suture (fil prolène 6/0). Tous les détails expérimentaux de ces procédures sont indiqués dans l'article du journal Biomacromolécules inséré en annexe du travail de thèse.

3. Obtention du modèle ischémique et implantation des hydrogels de chitosane

a) Modèle de ligature de l'artère coronaire gauche descendante

Les rats femelles Wistar de 200 grammes sont anesthésiés avec 2 à 3 % isoflurane (Baxter, Maurepas, France) : 3 % pour l'induction et 2 % pour l'entretien. Après intubation trachéale, la ventilation mécanique (Minerve, Esternay, France) est fixée à un taux de 70 respiration/min et avec un volume de 0,2 L en insufflation moyenne et la température corporelle est maintenue à 37°C (table d'opération chauffante thermostatée). Avant la thoracotomie, les animaux reçoivent une injection de 10 mg/kg de kétoprofène en sous cutanée (Merial, Lyon, France). Ils sont ensuite tondu très largement au niveau du côté gauche du thorax puis la zone est désinfectée avec de la bétadine. Le cœur est approché par une thoracotomie gauche au niveau du 4ème espace intercostal gauche. Les poumons sont écartés du champ opératoire et protégés à l'aide d'une compresse, puis le péricarde est incisé. L'infarctus du myocarde est créé par ligature permanente de l'artère coronaire gauche descendante (fil polypropylène 6-0, Ethicon, Somerville, NJ) (Figure 71).

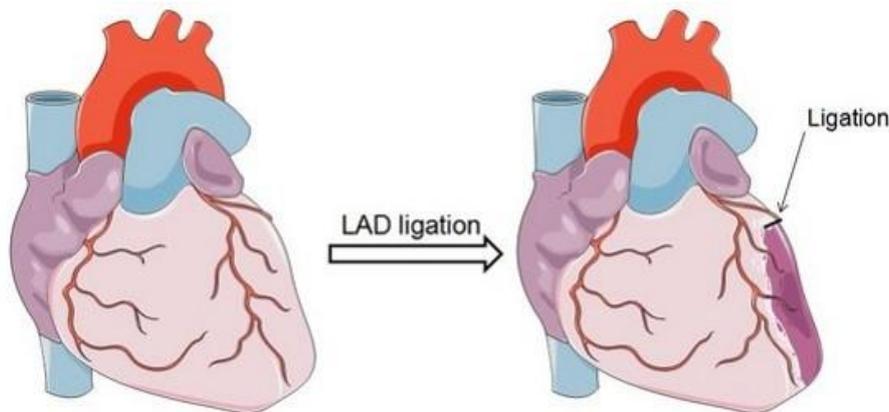


Figure 71 : Obtention du modèle d'insuffisance cardiaque ischémique par ligature de l'artère coronaire gauche descendante (LAD Ligature). Après la pose de la ligature, la zone qui n'est plus irriguée se nécrose et blanchit : c'est la zone infarctée (en violet sur le schéma).

L'ischémie est confirmée par un blanchiment visible du cœur sous la ligature. Le thorax est alors refermé par un monofil 4/0, aiguille CC1, Ethicon puis les rats reçoivent une injection de xylocaïne, à 7mg/kg, en local en intercostal et le pneumothorax est drainé. La peau est ensuite suturée (fil tressé 4/0, aiguille CC1, Ethicon) et les rats sont réhydratés avec du sérum physiologique à 37°C. Les animaux sont extubés dès qu'ils peuvent respirer spontanément. L'opération chirurgicale dure 20 minutes (5 minutes pour la réalisation des infarctus et 15 minutes pour la préparation des animaux et les sutures). A leur réveil, chaque rat est isolé dans une cage, au calme. Ils reçoivent une injection de kétoprofène à 10 mg/kg 24 heures post-op et jusqu'à 72 heures. Trois semaines après l'infarctus du myocarde, les rats subissent une évaluation échocardiographique pour analyser la fonction ventriculaire gauche (LV), et seulement ceux ayant une fraction d'éjection entre 20 à 45% sont sélectionnés pour le projet.

b) Implantation des patchs chez le rat ischémié

Trois semaines après la réalisation de l'infarctus chez les rats, les animaux sont opérés de nouveau pour l'implantation (ou non) des patchs. Les animaux sont anesthésiés avec 2 à 3 % isoflurane (Baxter, Maurepas, France) : 3 % pour l'induction et 2 % pour l'entretien. Après intubation trachéale, la ventilation mécanique (Minerve, Esternay, France) est fixée à un taux de 70 respiration/min et avec un volume de 0.2L en insufflation moyenne et la température corporelle est maintenue à 37°C (table d'opération chauffante thermostatée). Le thorax est désinfecté à la bétadine. Avant la sternotomie, les animaux reçoivent une injection de 10 mg/kg de kétoprofène en sous cutanée (Merial, Lyon, France). La sternotomie médiane est réalisée par incision de la peau avec un scalpel surmonté d'une lame stérile de 12 cm puis le sternum est coupé en son milieu avec des ciseaux à bouts arrondis. Les poumons sont écartés avec des compresses humides et le péricarde est incisé. Le cœur est séché avec une petite éponge et le patch de chitosane est placé sur la zone infarctée (ventricule gauche blanchi) et suturé avec 3 points de suture discontinus (fil polypropylène 6-0, Ethicon, Somerville, NJ). Les deux parties du sternum sont suturées en plaçant des points de suture entre les côtes avec un monofil 4/0, aiguille CC1, Ethicon. Le pneumothorax est drainé puis la peau est suturée par un fil tressé 4/0, (aiguille CC1, Ethicon). Les rats reçoivent une injection de buprénorphine 0,1 mg/kg en IP + xylocaïne, à 7mg/kg en sous-cutanée pour une action plus longue, et les rats sont réhydratés avec du sérum physiologique à 37°C. Les animaux sont extubés dès qu'ils peuvent respirer spontanément. L'opération chirurgicale dure 30 minutes environ (15 minutes pour l'implantation des patchs et 15 minutes pour la préparation et les sutures). A leur réveil, chaque rat est isolé dans une cage, au calme. Ils reçoivent une injection de kétoprofène à 10 mg/kg 24 heures post-op et jusqu'à 72 heures. Les animaux seront euthanasiés 14 jours après l'implantation pour étudier l'effet des patchs sur le myocarde. La procédure est illustrée dans la *Figure 72*.

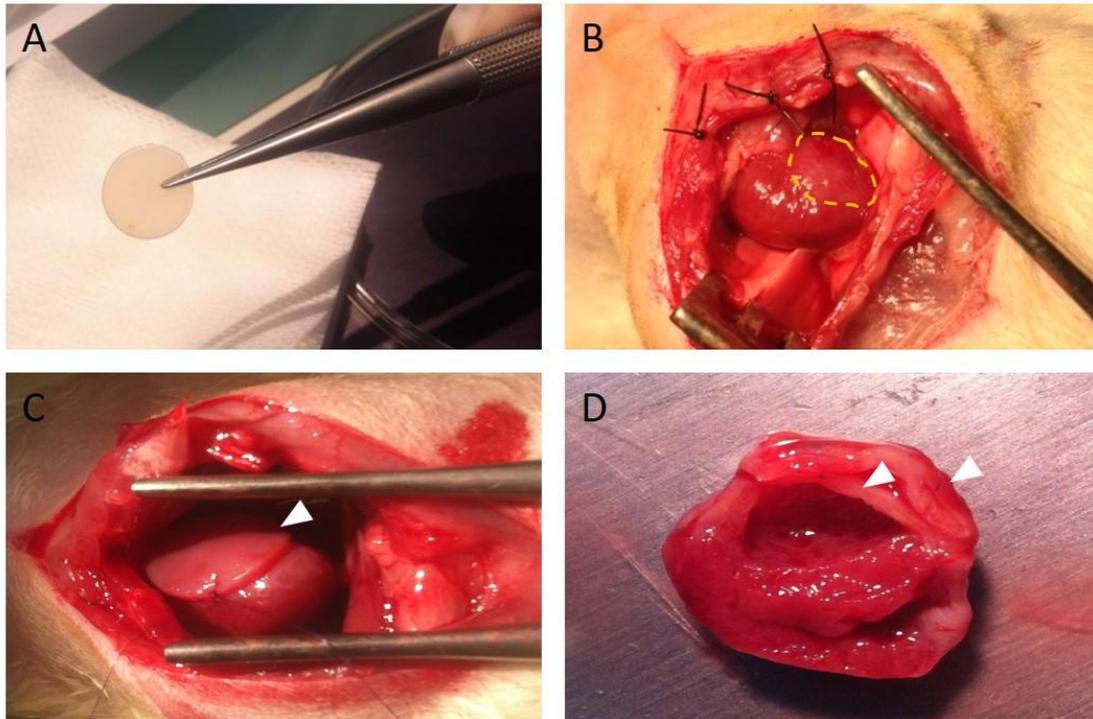


Figure 72 : Implantation des hydrogels de chitosane après la réalisation des infarctus. A) Observation du patch avant l'implantation, leur structure est rigide et facilement manipulable. B) Observation de la zone blanchit sur le cœur après réalisation de l'infarctus, C) Visualisation des patches implantés par sutures myocardiques, D) observation d'un cœur après section transversale : le myocarde infarci très afiné et blanchi est visible ainsi que le patch suturé.

c) Répartition des animaux par groupe

Trois semaines après la réalisation des infarctus chez des rats Wistar âgés de 2 mois, une première évaluation échocardiographique est réalisée. Les animaux dont la fraction d'éjection est inférieure ou égale à 50% sont inclus dans l'étude. Les patches de chitosane sont implantés pendant 1 mois. La fonction cardiaque est à nouveau mesurée et les cœurs sont prélevés pour effectuer les analyses. Deux formulations de patches de chitosane avaient été initialement fabriqués pour les études biologiques : ch-2,0-S-St et ch-3,5-S-St. Les premières implantations des hydrogels ch-3,5-S-St ont révélé une incompatibilité : la composition des hydrogels en chitosane influe de manière importante sur la rigidité de l'hydrogel, ce qui a induit des problèmes cardiaques suite à la greffe. Une nouvelle formulation a été donc ajoutée à l'étude biologique en remplacement des ch-3,5-S-St : ch-1,5-S-St. Au total, 32 animaux ont été inclus dans l'étude dont 12 animaux greffés avec les patches ch-2,0-S-St, 12 animaux ch-1,5-S-St et 8 animaux contrôle ayant un infarctus du myocarde sans traitement. La perte moyenne des animaux est de l'ordre de 20 %. Ce chiffre dépend de la réaction de l'animal après l'infarctus du myocarde mais également à la succession de deux opérations thoraciques lourdes.

4. Histologie et immunomarquage

Suite au sacrifice après la dernière échographie, les cœurs sont explantés et séparés en deux moitiés au travers de la zone infarctée. Les tissus sont immédiatement

fixés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures, déshydratés et inclus dans la paraffine. Des coupes en série sont effectuées puis colorées avec l'hématoxiline-éosine. Pour plus de détails concernant l'histologie et les immunomarquages, consulter la méthodologie des chapitres précédents.

5. Observation par IRM des cœurs infarctés après greffe des patches de chitosane

Après le prélèvement des cœurs infarctés, suite à l'implantation (ou non) des hydrogels de chitosane, certains cœurs sont placés dans une solution de cardioplégie à 4°C (CP1B solution hypertonique K [0,8mmol/ml] et Mg [0,8mmol/ml] et procaine) et transportés à la plateforme d'imagerie du centre CNRS à Gif-sur-Yvette. Les images IRM ont été obtenues par FLASH en 2D (Fast low angle shot magnetic resonance imaging). Cette technique permet d'obtenir des images IRM de manière très rapide. L'imagerie par résonance magnétique est une technique couramment utilisée pour le diagnostic médical. Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles et des coupes anatomiques de très haute précision à partir de l'observation de la résonance magnétique nucléaire des protons présents dans l'eau des tissus. La première étape consiste en un alignement des protons dans la même direction grâce à un aimant puissant. Une onde radio dont la fréquence correspond à la fréquence de rotation des protons est ensuite émise pour apporter l'énergie aux protons (phénomène de résonance) et leur permettre de se synchroniser. A l'arrêt de l'aimant, les protons vont se désynchroniser et revenir à leur état initial en émettant un signal (une onde qu'il est possible de capter). Une cartographie de la localisation de ces protons est alors possible par détection spatiale du signal émis et donne une image. La morphologie du signal émis par les protons dépend du temps que mettent les protons à revenir dans l'axe de l'aimant (temps T1 de relaxation) et du temps qu'ils mettent à se déphaser de nouveau (temps T2). Ces deux temps sont spécifiques de chaque tissu en fonction de sa composition en eau. Dans le cas de l'IRM FLASH, la mesure des temps T1 et T2 est raccourcie drastiquement (jusqu'à deux ordres de grandeur) sans perte de la qualité des images. La reconstruction de l'image réalisée par IRM FLASH en temps réel possède une résolution temporelle de 20 millisecondes (1/50ème de seconde) soit une réduction du temps d'acquisition d'un facteur de 10 000 par rapport à 1985. Plus récemment, les acquisitions par IRM FLASH ont été combinées avec une reconstruction des images itératives régularisées par inversion non linéaire pour atteindre un IRM en temps réel avec une résolution temporelle de 20 à 30 millisecondes pour les images avec une résolution spatiale de 1,5 à 2,0 millimètres. Les paramètres de résolution utilisés pour l'analyse des cœurs de rats sont les suivants :

- 2D-section axiale Z FLASH E3 256x256_0.5mm NS=4
- 2D-section sagittale X FLASH E4 256x256_0.5mm NS=4
- 2D-section coronale Y FLASH E5 256x256_0.5mm NS=4

Résultats

1. Caractérisation physico-chimique des hydrogels de chitosane

a) Concentration en chitosane

La concentration en chitosane diffère entre celle de la solution initiale utilisée pour la fabrication et celle de l'hydrogel final. Ainsi comme nous pouvons le voir en *Figure 73*, pour les hydrogels stérilisés et gélifiés avec la méthode du NaOH aqueux (Ch-S-St), ayant un pourcentage initial de 1,5%, 2% ou 3,5%, ont en réalité un pourcentage de chitosane respectivement d'environ 3%, 4% et 7%. Ce sont ces valeurs qui seront utilisées pour la suite de la caractérisation physico-chimique des hydrogels. Le processus de stérilisation affecte légèrement cette concentration (comparaisons des courbes Ch-S et Ch-S-St) au contraire du processus de gélification utilisé (courbes Ch-N et Ch-N-St). En effet, parmi les deux méthodes de gélification utilisées (voir Préparation des hydrogels physiques de chitosane, page 157) nous nous sommes focalisés sur la méthode du NaOH aqueux qui a été utilisé pour l'évaluation biologique des hydrogels. Les différences observées entre ces deux méthodes, dans la caractérisation physico-chimique de ces hydrogels, ne seront pas discutées ici mais sont accessibles dans l'article intégré à la partie annexe.

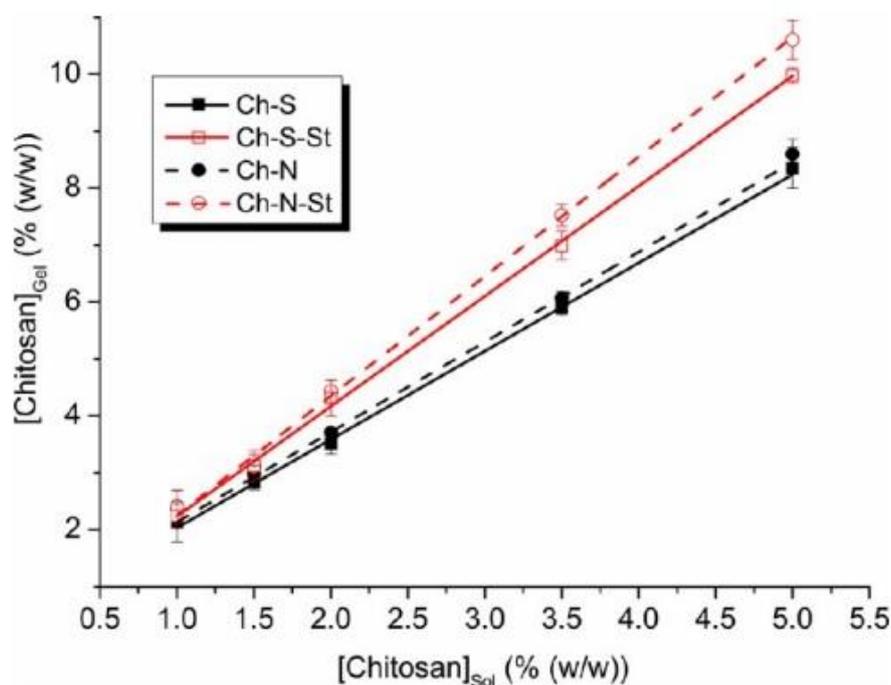


Figure 73 : Concentration finale en chitosane dans les hydrogels ($[Chitosan]_{Gel}$) avant stérilisation (Ch-S et Ch-N) et après stérilisation (Ch-S-St et Ch-N-St) en fonction de la concentration initiale de la solution de chitosane ($[Chitosan]_{Sol}$).

b) Allongement à la rupture

L'allongement à la rupture est une caractéristique des matériaux. Elle représente la capacité du matériau à s'allonger sous la contrainte d'une traction avant de casser. Pour les hydrogels de chitosane Ch-S-St, ce paramètre varie avec la concentration en

chitosane (Figure 74). Plus la concentration est importante plus l'hydrogel peut s'allonger avant de rompre. Les hydrogels utilisés dans cette étude ont un allongement à la rupture compris entre 25 % et 55%. Lors de la contraction, le cœur subit une déformation du même ordre de grandeur puisque la valeur normale, pour l'Homme, de la fraction de raccourcissement de la surface du ventricule gauche est de l'ordre de 0,4 à 0,5 (soit 40 à 50%).

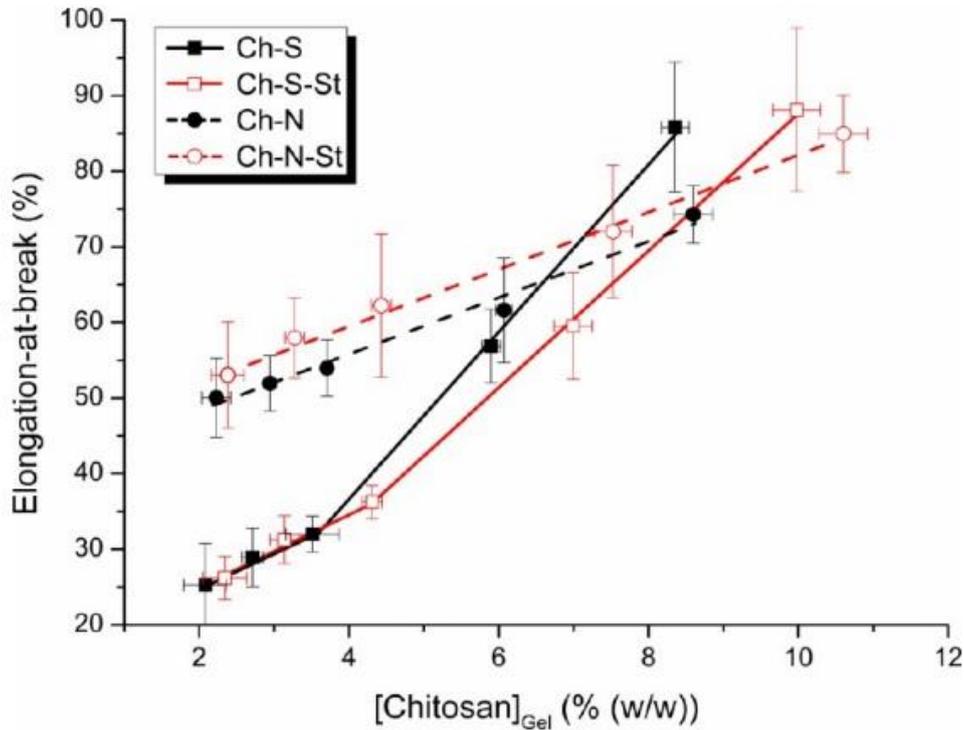


Figure 74 : Allongement à la rupture des hydrogels non stérilisés (Ch-S et Ch-N) ou stérilisés (Ch-S-St et Ch-N-St) en fonction de la concentration finale en chitosane ([Chitosan]_{Gel}).

c) Module élastique

Le module élastique est également un paramètre important qui doit être compatible avec celui du cœur. Ainsi, les hydrogels de chitosane Ch-S-3,5-St, qui ont une concentration en chitosane de 7% (Figure 73), présentent un module élastique d'environ 70 kPa comme indiqué sur la Figure 75. Cette rigidité est incompatible avec celle du cœur en diastole (environ 10-20 kPa, (Engler et al. 2008)) ce qui induit une contrainte trop importante sur le myocarde suite à la l'implantation de cet hydrogel. Cette contrainte a été à l'origine du décès prématuré des animaux implantés avec les hydrogels Ch-S-3,5-St. Il apparait clairement que seuls les hydrogels, gélifiés avec le NaOH aqueux, composé de moins de 4% de chitosane final (environ 2% de chitosane initial), ont une rigidité compatible avec une greffe épicaudique. En effet, les hydrogels de composition en chitosane plus faible (ch-2,0-S-St et ch-1,5-S-St) ont une rigidité respectivement de 30 et 20 kPa. Ils sont plus adéquats pour être supportés par le cœur. Seuls ces deux derniers hydrogels ont donc été évalués pour la greffe épicaudique.

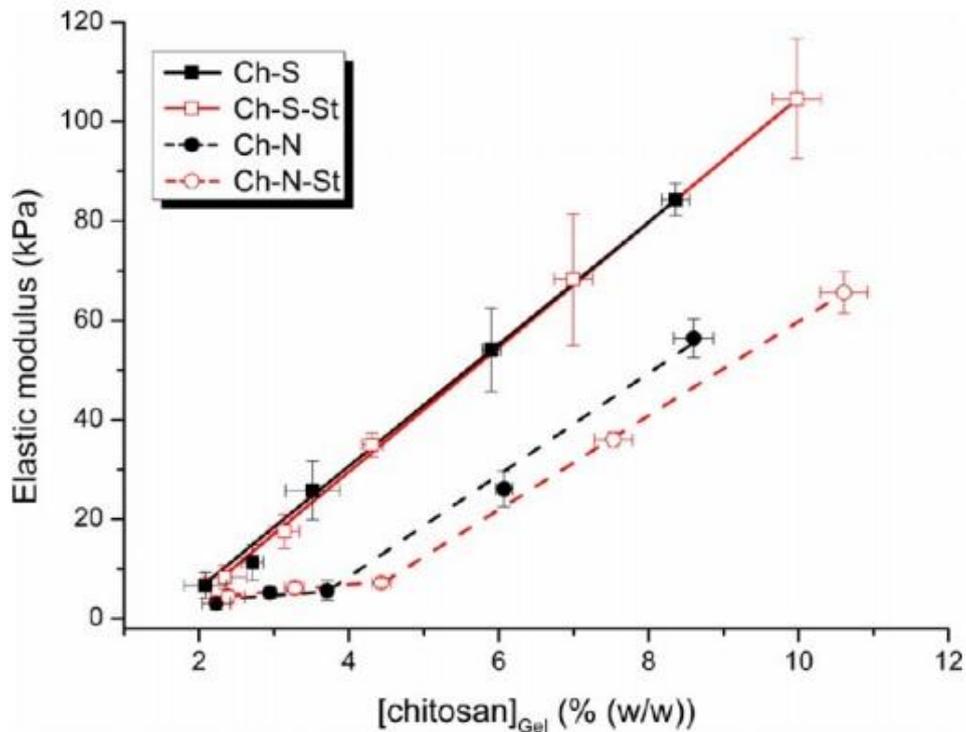


Figure 75 : Module élastique des hydrogels non stérilisés (Ch-S and Ch-N) ou stérilisés (Ch-S-St et Ch-N-St) en fonction de la concentration finale en chitosane ($[Chitosan]_{Gel}$).

d) Test de suturabilité

Enfin, les hydrogels ont fait l'objet d'une évaluation de résistance à la suture, un paramètre important pour des patches dont le destin est d'être suturé sur le myocarde. Les contractions cardiaques peuvent en effet induire un stress important sur les sutures et être à l'origine du déchirement du patch si celui-ci n'est pas assez résistant. Pour mesurer ce paramètre, une suture est faite dans l'hydrogel (épaisseur 1 mm) et une force est appliquée graduellement sur le fil (0,5 N/min) jusqu'à rupture. Les hydrogels testés (Ch-S-1,5-St et Ch-S-2-St) possèdent une résistance à la suture comprise d'environ 10 gf/mm (Figure 76) ce qui est suffisant pour résister aux contraintes de la greffe épicaudique (Mayrose et al. 1999).

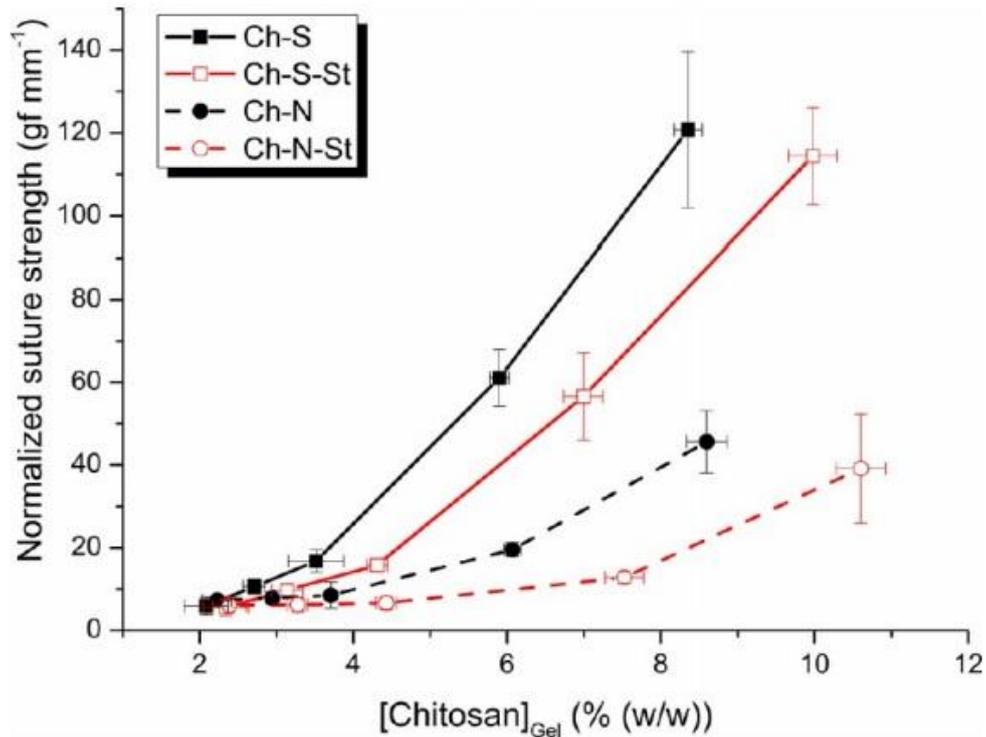


Figure 76 : Résistance à la suture normalisée des hydrogels non stérilisés (Ch-S et Ch-N) ou stérilisés (Ch-S-St et Ch-N-St) en fonction de la concentration finale en chitosane ([Chitosan]_{Gel}) (1 gf = 1 Gram-Force = 0,0098 Newton).

2. Evaluation biologique des hydrogels de chitosane

Après avoir caractérisé les hydrogels de chitosane de manière physico-chimique, les patches ont été testés *in vivo* afin d'évaluer leur biocompatibilité et leur biofonctionnalité dans un modèle d'insuffisance cardiaque d'origine ischémique chez le rat. Les patches Ch-2,0-S-St et Ch-1,5-S-St ont été implantés pendant 1 mois (Rappel : les patches ch-3,5-S-St ont été retirés de l'étude car non compatibles avec le cœur). La fonction cardiaque a été évaluée trois semaines après la réalisation de l'occlusion coronaire (Baseline) et 1 mois après l'implantation des hydrogels à la surface de la zone infarctée (Endpoint). Les résultats sont présentés dans la *Figure 77*. L'analyse de différents paramètres cardiaques dont la mesure du volume du ventricule gauche en fin de diastole et de la fraction d'éjection a donné des résultats non significatifs ce qui suggère que les patches n'ont pas permis une amélioration de la fonction cardiaque. Cependant aucune dégradation de la fonction n'est observable démontant la biocompatibilité et la sécurité des hydrogels de chitosane. On peut noter que, une fois l'infarctus installé et en l'absence de traitement, la fonction cardiaque ne se dégrade pas après 1 mois d'implantation.

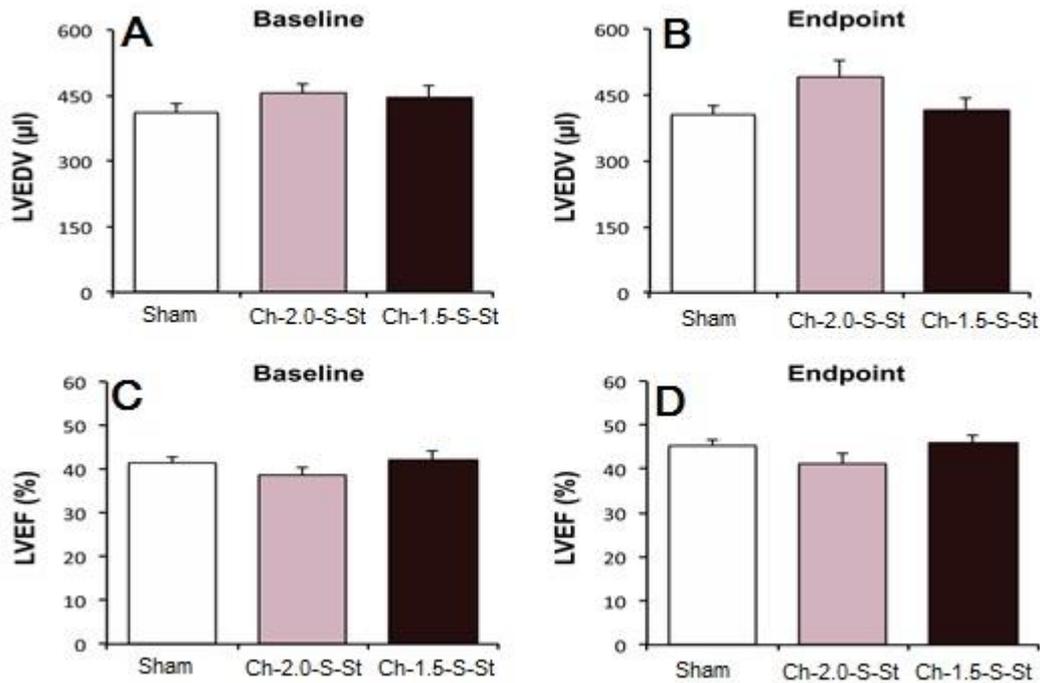


Figure 77 : Analyses de la fonction cardiaque par échocardiographie transthoraciques. Les données baseline correspondent aux mesures effectuées avant et endpoint après l'implantation des patches de chitosane. LVEDV : Volume du ventricule gauche en fin de diastole ; LVEF : fraction d'éjection du ventricule gauche.

Après sacrifice des animaux, les cœurs ont été prélevés et certains ont été analysés par IRM (Figure 78). L'IRM permet de réaliser des coupes virtuelles des tissus et ainsi de visualiser les cœurs greffés avec les patches in toto. Sur les images IRM, les infarctus sont des zones de tissu nécrosé contenant peu d'eau, ils apparaissent donc de couleur sombre tandis que les hydrogels de chitosane qui sont majoritairement constitués d'eau apparaissent en gris clair. D'après les images d'IRM FLASH, l'infarctus est visible uniquement sur le ventricule gauche selon les différents angles de vue (A, B et C). Il est transmural et situé sur les 2/3 du cœur en partant de l'apex. La paroi infarctée est très affinée et le ventricule gauche a commencé à se dilater.

Concernant les images du cœur greffé avec un hydrogel de chitosane ch-1,5- S-St (D, E et F), le patch est présent 1 mois après l'implantation et ne semble pas s'être dégradé. Il a été greffé au-dessus de la zone infarctée et recouvre toute la longueur de la paroi du ventricule gauche. Sa taille est d'ailleurs légèrement supérieure à celle du cœur. Le patch semble bien intégré au myocarde infarcté et l'épaisseur du patch est similaire à celle du myocarde normal.

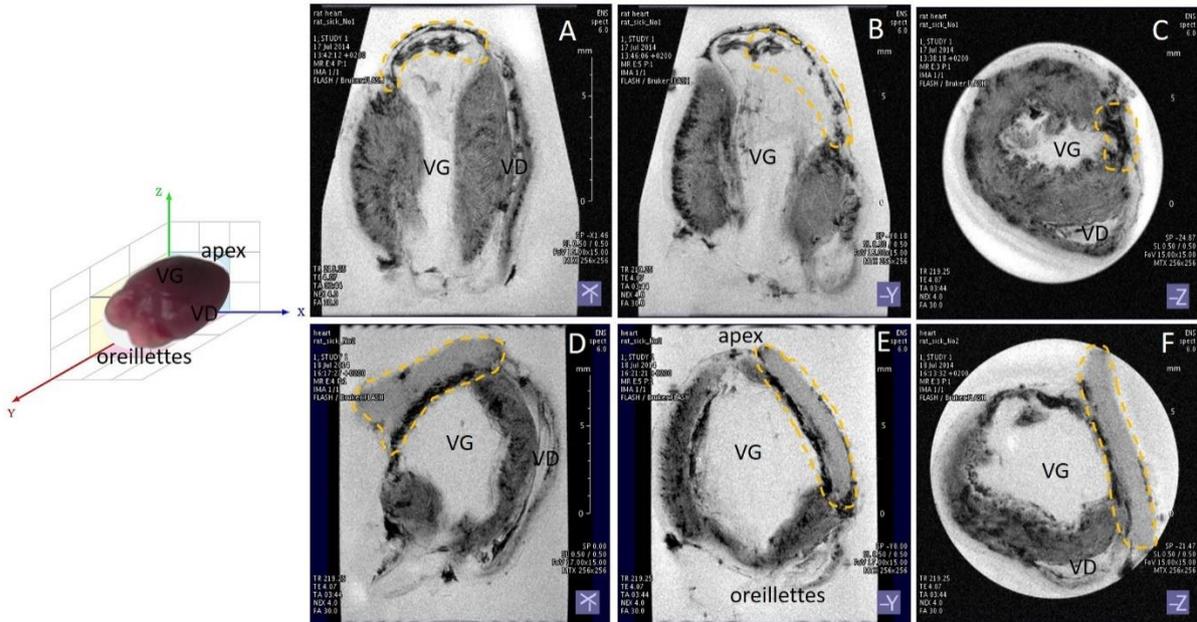


Figure 78 : Images obtenues par Imagerie à Résonance Magnétique Nucléaire FLASH selon les axes X, Y et Z correspondant aux vues sagittales, coronales et axiales d'un cœur infarcté (A à C) et d'un cœur infarcté après greffe d'un patch de chitosane ch-1,5- S-St (D à F). L'infarctus correspond à la zone sombre où le myocarde est très affiné (pointillé jaune) et le patch est visible sur les images D, E et F par une zone plus claire (pointillé jaune). Il a été implanté au-dessus de la zone infarctée pour combler la perte de tissu myocardique.

L'IRM a permis d'effectuer une première analyse des hydrogels. Afin d'obtenir une analyse plus poussée de la réaction du patch sur le myocarde infarcté, une étude histologique sur coupes paraffines ainsi qu'une étude immunohistochimique sur coupes congelées ont ensuite été réalisées. L'inclusion des tissus dans la paraffine permet d'obtenir une analyse histologique et morphologique des cellules présentes dans les tissus. Cependant l'utilisation de coupes congelées pour la détection de protéines par immunomarquage est nécessaire pour confirmer les observations, c'est pourquoi les deux types de coupes ont été réalisées dans cette étude.

L'analyse histologique de la jonction patch/myocarde a montré des différences entre les hydrogels Ch-2,0-S-St et Ch-1,5-S-St (Figure 79). En effet, dans un premier temps, la dégradation des patches semble différente : les hydrogels Ch-1,5-S-St présentent des signes de dégradation (formation de trous et de travées) tandis que les hydrogels Ch-2,0-S-St n'en possèdent que très peu. Dans un second temps, la dégradation des hydrogels est corrélée à la colonisation différente des patches par les cellules hôtes. Des cellules ont infiltré les hydrogels Ch-1,5-S-St à l'intérieur des travées et des trous. La fragilisation des hydrogels a donc permis une meilleure infiltration des cellules. Dans un troisième temps, la fibrose présente dans la zone infarctée à l'endroit où les patches de chitosane ont été greffés semble plus fine après l'implantation des patches Ch-1,5-S-St. De plus, l'adhérence des patches sur le myocarde est plus faible pour les patches Ch-2,0-S-St. Des espaces sont visibles entre l'hydrogel et le myocarde (*). La présence de cellules géantes multinuclées dans les tissus à proximité des patches Ch-2,0-S-St est un signe de faible biocompatibilité. A l'inverse, la présence de cellules infiltrées mononuclées dans les hydrogels Ch-1,5-S-

St est un bon indicateur de biocompatibilité. Les hydrogels Ch-1,5-S-St ayant la plus faible concentration de chitosane avec la plus faible rigidité de l'ensemble des hydrogels testés semblent être les meilleurs pour l'implantation cardiaque.

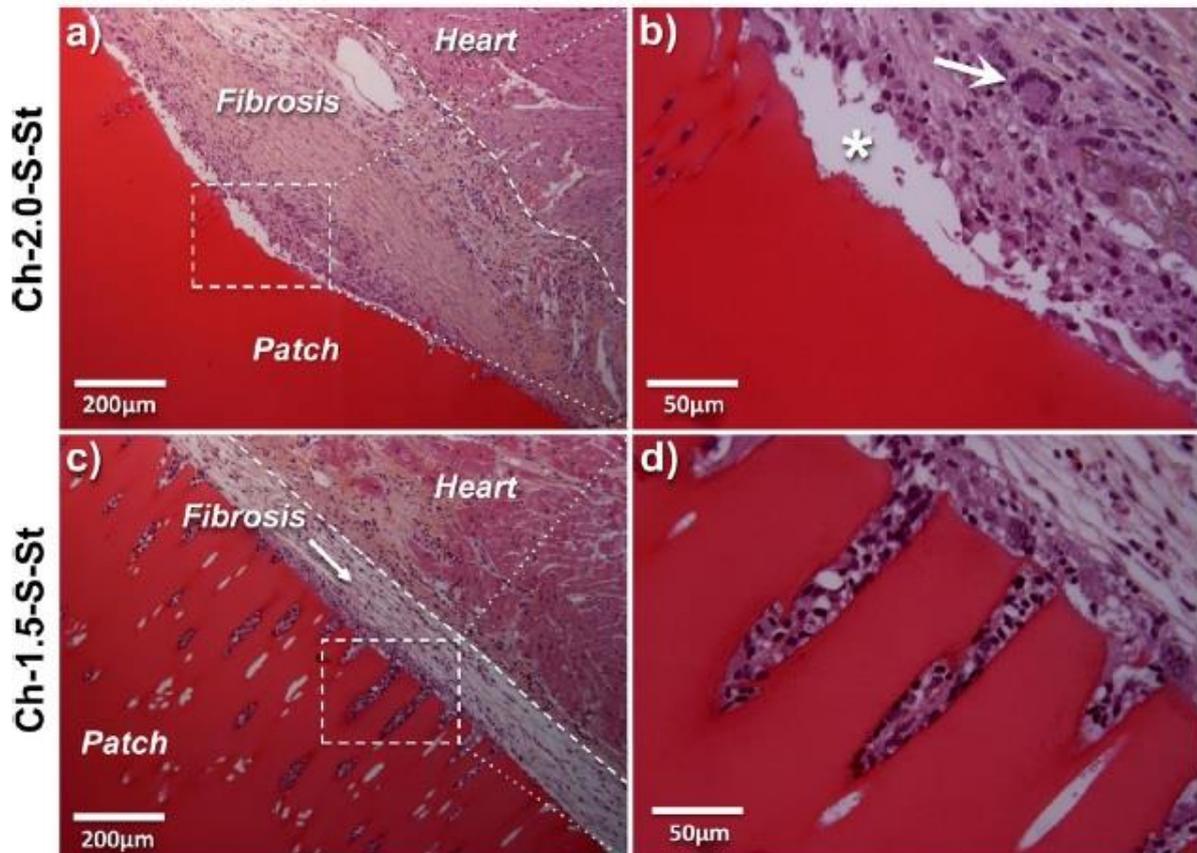


Figure 79 : Etude de la colonisation des hydrogels de chitosane Ch-2,0-S-St (a et b) et Ch-1,5-S-St (c et d) après 1 mois de greffe et analyse du tissu fibreux présent dans la zone infarctée par coloration hématoxyline-éosine sur coupes paraffines des cœurs. Les hydrogels apparaissent en rose vif sur les images. Barre d'échelle : a et c) 200µm et b et d) 50µm.

De nombreuses cellules de l'hôte ont colonisé les hydrogels Ch-1,5-S-St. L'étude du phénotype de ces cellules a été effectuée en analysant en détail les coupes paraffines après coloration hématoxyline-éosine et après différents immunomarquages (Figure 80). La présence de cellules dans les travées de dégradation des hydrogels a d'abord été vérifiée par immunomarquage nucléaire. La forme des noyaux révélés par le marquage Hoechst semble indiquer que ces cellules sont viables. L'observation des cellules, à partir des coupes paraffines, a démontré la présence de cellules inflammatoires (macrophages) mais également des fibroblastes à l'origine du tissu fibreux. Des cellules endothéliales semblent également présentes sur les coupes paraffines des hydrogels greffés mais également sur les immunomarquages. En effet, des cellules RECA-1 positives sont présentes dans les travées des hydrogels.

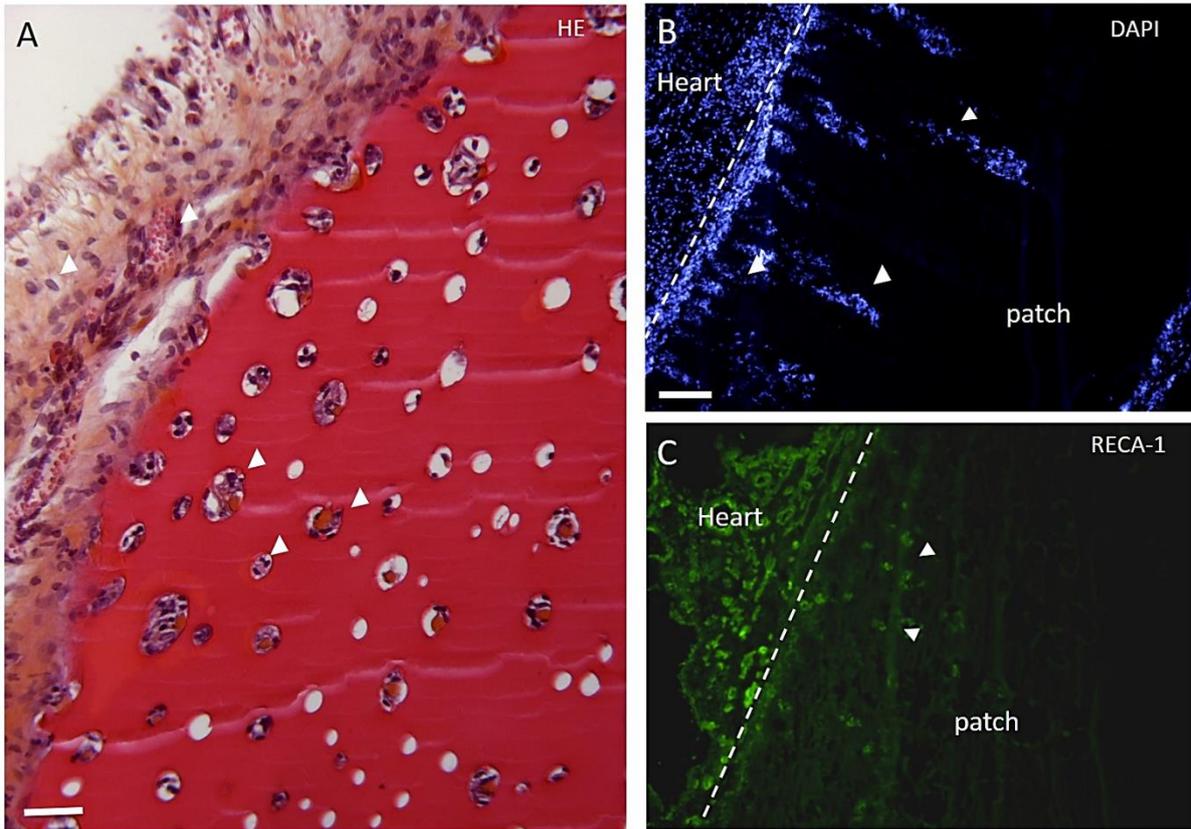


Figure 80 : Caractérisation des cellules ayant infiltré les hydrogels à Ch-1,5- S-St de chitosane par coloration hématoxyline-éosine sur coupe paraffine (A) et immunomarquages des noyaux (DAPI) et des cellules endothéliales (RECA-1) (B et C). Barre d'échelle : 50 μ m (A) et 200 μ m (B et C).

Conclusion

Cette étude a démontré qu'il est possible d'obtenir des hydrogels physiques de chitosane en utilisant deux méthodes de gélification (NaOH aqueux ou NH₃ gazeux). En fonction du processus de gélification utilisé et de la concentration de chitosane employée, les paramètres physico-chimiques des hydrogels obtenus varient fortement. De même, la stérilisation par autoclave induit aussi des modifications de ces propriétés physico-chimiques. Il est également démontré que ces hydrogels peuvent être conservés pour de longues périodes sans perdre leurs propriétés physico-chimiques (voir article en annexe).

Cette étude nous a permis de démontrer que les hydrogels gélifiés par la méthode du NaOH aqueux, stérilisés et contenant une concentration initiale inférieure à 2% de chitosane était compatible, d'un point de vue physico-chimique, avec la greffe épiscopordique. Ces hydrogels possèdent en effet un module élastique similaire à celui du myocarde (en diastole), ont un allongement à la rupture et une suturabilité compatible avec les contraintes de la greffe épiscopordique.

Les hydrogels de chitosane produits à partir d'une solution initiale de 1,5% sont ainsi parfaitement implantés sur le cœur et présentent une dégradation partielle qui s'accompagne de l'infiltration de cellules mononuclées qui présentent, pour partie, un phénotype endothélial. Cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence une amélioration de la fonction cardiaque suite à la greffe de ces hydrogels. Cependant, il faut noter que l'implantation épiscopordique de ces hydrogels ne s'accompagne pas d'une dégradation de la fonction cardiaque dans un modèle d'infarctus chez le rat. Ainsi ces hydrogels semblent ne pas avoir d'effets délétère sur la fonction cardiaque. Tous ces résultats montrent que les hydrogels de chitosane possèdent les caractéristiques physico-chimiques, mécaniques et biologiques optimales pour un usage en thérapie cardiaque.

Discussion et Perspectives

Malgré des résultats positifs concernant la biocompatibilité et l'absence de toxicité et d'effets délétères des hydrogels de chitosane, nous n'avons pas pu mettre en évidence une amélioration fonctionnelle suite à l'implantation dans un modèle d'infarctus chez le rat. L'hypothèse principale de cette absence d'effet est que les hydrogels de chitosane ne permettent pas une infiltration cellulaire suffisante pour induire une angiogénèse assez rapide permettant une perfusion de la zone infarctée. Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, le degré d'acétylation du chitosane est responsable, au moins en partie, de ses propriétés biologiques (Chatelet, Damour, et Domard 2001). Le chitosane utilisé dans cette étude possède un faible degré d'acétylation (2,8%). Des études ont démontré que des degrés d'acétylation plus élevés pouvaient avoir un impact positif sur la bioactivité du chitosane. Ainsi, en 2010 Barbosa et al., ont étudié la réaction inflammatoire induite par le chitosane ayant un degré d'acétylation de 4% ou 15% (Barbosa et al. 2010). A l'aide du modèle sous-cutané de la poche d'air (air-pouch), ils ont démontré que le chitosane ayant un degré d'acétylation de 15% possède la plus forte capacité à attirer les leukocytes et les cellules inflammatoires. Comme l'inflammation et la régénération sont des processus étroitement intriqués, ce résultat suggère que le degré d'acétylation du chitosane pourrait être un paramètre important dans le cadre de la thérapie cardiaque. De la même manière, une étude plus récente (Haastert-Talini et al. 2013), effectuée dans le cadre de la thérapie de reconstruction artificielle du système nerveux périphérique, a démontré qu'un degré d'acétylation supérieur à celui employé dans notre étude (5% vs 2,8%) était plus favorable qu'un faible degré d'acétylation. Une des pistes d'amélioration des patchs de chitosane pourrait donc être d'augmenter son degré d'acétylation. Une étude préliminaire est en cours au laboratoire et j'ai pu effectuer l'implantation de patchs de chitosane ayant un degré d'acétylation de 38%. Les premiers résultats fonctionnels de cette étude sont indiqués dans la *Figure 81*.

Les rats implantés avec le patch en hydrogel de chitosane (degré d'acétylation = 38%) ont une fonction cardiaque améliorée comparativement au groupe contrôle comme le démontre la diminution de la variation des volumes télésystoliques et télédiastoliques (diminution de la dilation cardiaque liée à l'infarctus) et l'amélioration du volume d'éjection comparativement au groupe contrôle. Les variations fractions d'éjection du groupe traité sont également améliorées comparativement au groupe contrôle ($8,89\% \pm 3,75\%$ vs $-12,41\% \pm 1,41\%$). Les analyses histologiques de ces cœurs sont en cours au laboratoire. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que ce degré d'acétylation supérieur a induit une réaction inflammatoire plus importante qui pourrait conduire à l'activation de voie de réparation endogène et/ou à une angiogénèse plus importante au site d'implantation (pour rappel, les hydrogels sont greffés sur la cicatrice fibreuse). Les mécanismes de cette amélioration fonctionnelle seront analysés au laboratoire.

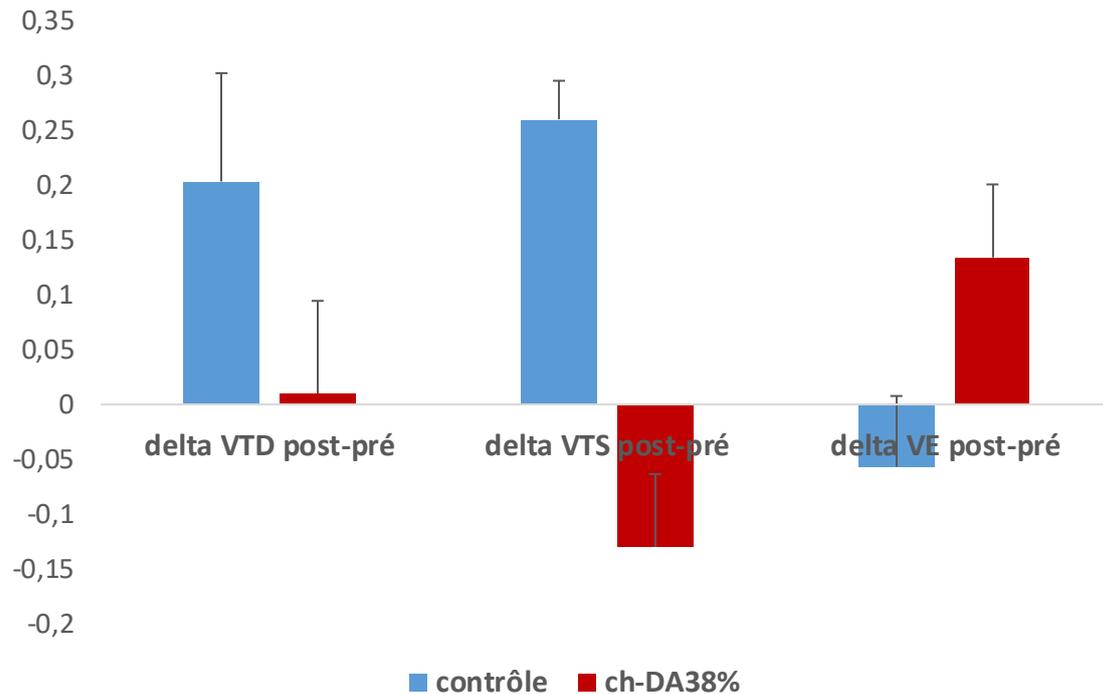


Figure 81 : Variation des volumes télédiastoliques (VTD), télésystoliques (VTS) et d'éjection (VE) avant et après la greffe (en mL) suite à l'implantation d'un hydrogel de chitosane ayant un degré d'acétylation (DA) de 38% (n=5). Le groupe contrôle correspond à des rats infarctés ayant subi une injection de PBS intracardiaque (n=3).

Les futurs développements des hydrogels de chitosane se focaliseront sur l'accélération des cinétiques de résorption, l'amélioration de l'infiltration de macrophages et de l'induction de la polarisation de ces macrophages vers le phénotype M2 pour favoriser la reconstruction tissulaire.

Dans un deuxième temps, ce type de biomatériau pourrait également être utilisé pour délivrer, localement, des biomolécules cardioprotectrices afin d'améliorer les effets fonctionnels. Ainsi il est connu (*voir Introduction Générale*) que les cellules souches mésenchymateuses sont impliquées dans la réparation du tissu cardiaque grâce à leur capacité à sécréter de nombreuses molécules modulatrices. Ces facteurs sécrétés sont désignés sous le terme de « sécrétome ». Ce sécrétome peut être isolé à partir du milieu de culture de ces cellules. Les hydrogels de chitosane peuvent alors être enrichis avec ce sécrétome afin de favoriser l'invasion cellulaire de l'hydrogel ce qui devrait permettre d'améliorer la régénération cardiaque. Cette stratégie sera développée dans les années à venir au laboratoire.

Bibliographie du chapitre 3

- Barbosa, Judite N., Isabel F. Amaral, Artur P. Aguas, et Mário A. Barbosa. 2010. « Evaluation of the Effect of the Degree of Acetylation on the Inflammatory Response to 3D Porous Chitosan Scaffolds ». *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 93 (1): 20-28. doi:10.1002/jbm.a.32499.
- Chatelet, Claire, Odile Damour, et Alain Domard. 2001. « Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films ». *Biomaterials* 22 (3): 261-68. doi:10.1016/S0142-9612(00)00183-6.
- Engler, Adam J., Christine Carag-Krieger, Colin P. Johnson, Matthew Raab, Hsin-Yao Tang, David W. Speicher, Joseph W. Sanger, Jean M. Sanger, et Dennis E. Discher. 2008. « Embryonic Cardiomyocytes Beat Best on a Matrix with Heart-like Elasticity: Scar-like Rigidity Inhibits Beating ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 22): 3794-3802. doi:10.1242/jcs.029678.
- Gorzelanny, Christian, Birgit Pöppelmann, Elwira Strozzyk, Bruno M. Moerschbacher, et Stefan W. Schneider. 2007. « Specific Interaction between Chitosan and Matrix Metalloprotease 2 Decreases the Invasive Activity of Human Melanoma Cells ». *Biomacromolecules* 8 (10): 3035-40. doi:10.1021/bm0703214.
- Haastert-Talini, Kirsten, Stefano Geuna, Lars B. Dahlin, Cora Meyer, Lena Stenberg, Thomas Freier, Claudia Heimann, et al. 2013. « Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects ». *Biomaterials* 34 (38): 9886-9904. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.074.
- Ishihara, M., K. Ono, M. Sato, K. Nakanishi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, et al. 2001. « Acceleration of Wound Contraction and Healing with a Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel ». *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 9 (6): 513-21.
- Kong, Ming, Xi Guang Chen, Ke Xing, et Hyun Jin Park. 2010. « Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review ». *International Journal of Food Microbiology* 144 (1): 51-63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
- Liu, Zhiqiang, Haibin Wang, Yan Wang, Qiuxia Lin, Anning Yao, Feng Cao, Duxue Li, et al. 2012. « The influence of chitosan hydrogel on stem cell engraftment, survival and homing in the ischemic myocardial microenvironment ». *Biomaterials* 33 (11): 3093-3106. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.044.
- Lu, Wen-Ning, Shuang-Hong Lü, Hai-Bin Wang, De-Xue Li, Cui-Mi Duan, Zhi-Qiang Liu, Tong Hao, et al. 2009. « Functional Improvement of Infarcted Heart by Co-Injection of Embryonic Stem Cells with Temperature-Responsive Chitosan Hydrogel ». *Tissue Engineering. Part A* 15 (6): 1437-47. doi:10.1089/ten.tea.2008.0143.
- Mayrose, J., D. V. Jehle, R. Moscati, E. B. Lerner, et B. J. Abrams. 1999. « Comparison of Staples versus Sutures in the Repair of Penetrating Cardiac Wounds ». *The Journal of Trauma* 46 (3): 441-443-444.
- Montebault, A., K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M.-T. Corvol, et A. Domard. 2006. « A Material Decoy of Biological Media Based on Chitosan Physical Hydrogels: Application to Cartilage Tissue Engineering ». *Biochimie* 88 (5): 551-64. doi:10.1016/j.biochi.2006.03.002.
- Rabea, Entsar I., Mohamed E.-T. Badawy, Christian V. Stevens, Guy Smagghe, et Walter Steurbaut. 2003. « Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action ». *Biomacromolecules* 4 (6): 1457-65. doi:10.1021/bm034130m.
- Rao, S. B., et C. P. Sharma. 1997. « Use of Chitosan as a Biomaterial: Studies on Its Safety and Hemostatic Potential ». *Journal of Biomedical Materials Research* 34 (1): 21-28.
- Vårum, K. M., M. M. Myhr, R. J. Hjerde, et O. Smidsrød. 1997. « In Vitro Degradation Rates of Partially N-Acetylated Chitosans in Human Serum ». *Carbohydrate Research* 299 (1-2): 99-101.
- Wang, Haibin, Xuelian Zhang, Yanmin Li, Yitong Ma, Ye Zhang, Zhiqiang Liu, Jin Zhou, et al. 2010. « Improved myocardial performance in infarcted rat heart by co-injection of basic fibroblast growth factor with temperature-responsive Chitosan hydrogel ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 29 (8): 881-87. doi:10.1016/j.healun.2010.03.016.
- Yuan, Ying, Peiyun Zhang, Yuming Yang, Xiaodong Wang, et Xiaosong Gu. 2004. « The Interaction of Schwann Cells with Chitosan Membranes and Fibers in Vitro ». *Biomaterials* 25 (18): 4273-78. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.11.029.
- Zhu, Lin, Lin Peng, et Yu-Qing Zhang. 2015. « The Processing of Chitosan and Its Derivatives and Their Application for Postoperative Anti-Adhesion ». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 15 (4): 330-37.

Conclusion, Discussion et Perspectives Générales de la thèse

Conclusion générale

La technologie des feuilles de cellules associant des cellules nourricières servant de support trophique pour les cellules souches cardiaques est une stratégie prometteuse. Néanmoins dans un contexte de thérapie cellulaire cardiaque, même si les feuilles de cellules présentent de nombreux avantages, elles ont également des inconvénients. En effet, la co-culture des deux types cellulaires est une étape déterminante pour l'obtention des feuilles. L'analyse des feuilles de cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux (ADSC) a montré des résultats intéressants concernant la stabilisation de la fonction cardiaque du modèle murins de cardiomyopathie dilatée cependant la co-culture avec les précurseurs cardiaques n'a pas été possible. A contrario, l'association des myoblastes avec les précurseurs a été possible mais la greffe épicaudique des feuilles composites s'est révélée décevante. Ces deux études ont permis de montrer le potentiel thérapeutique des feuilles d'ADSC mais a également mis en évidence une maniabilité réduite avec une fragilité élevée rendant les implantations difficiles. Ne possédant pas de support physique externe autre que la matrice extracellulaire produite par les cellules elles-mêmes, il est difficile de moduler les paramètres physico-chimiques comme la rigidité, la rétention et l'organisation des cellules d'intérêt.

C'est pourquoi les matrices en nanofibres de collagène ont été développées. En effet, les matrices électrospinnées en collagène possèdent des caractéristiques physico-chimiques proches de celles du myocarde, notamment concernant la rigidité de 10kPa. L'utilisation du collagène, protéine native abondamment présente dans la matrice extracellulaire cardiaque, a montré de très bons résultats concernant l'inocuité, la biocompatibilité pour des cellules souches pluripotentes induites humaines dérivées en cardiomyocytes (iPS-CM), et la réponse inflammatoire induite. Les patchs préparés avec 10% d'acide citrique, chauffé à 150°C pendant 150 minutes et ensemencés avec des iPS-CM ont permis une amélioration significative de la fonction cardiaque des animaux en insuffisance cardiaque. Malgré l'absence des cellules greffées 14 jours après l'implantation, une amélioration de l'angiogénèse et une induction du remodelage cardiaque bénéfique peuvent suggérer que les matrices de collagène associées aux hiPS-CM permettent l'activation de certaines voies de réparation cardiaque endogène via des facteurs paracrines. Autrement dit, les patchs de collagène ont induit une diminution du processus de remodelage délétère et/ou un prolongement du remodelage bénéfique. Cependant, l'absence des cellules après la greffe, démontre que les matrices de collagène doivent encore être améliorées.

Malgré de nombreuses années de recherche dans le domaine de la thérapie cellulaire cardiaque, retrouver les cellules d'intérêt plusieurs jours/semaines après la greffe demeure un épineux problème. De nombreuses études ont montré que l'effet bénéfique induit par la présence des cellules dans les biomatériaux passe très souvent par l'activation des voies paracrines. L'effet bénéfique dépendrait donc de la quantité/qualité des facteurs produits par les cellules avant et pendant leur disparition.

Une des pistes de réflexion serait donc de développer des biomatériaux contenant uniquement les facteurs produits par les cellules d'intérêt. Pour une approche de traitement par greffe épiscopordique, le développement d'un patch modulable physiquement et chimiquement est alors nécessaire. C'est dans cette optique que les hydrogels de chitosane ont été évalués. Les résultats ont permis de définir un protocole d'obtention des hydrogels dont les propriétés physico-chimiques telles que la concentration en chitosane, la suturabilité, la résistance à l'élongation, la rigidité et la conservation sur le long terme ont été modulées. Les implantations des hydrogels dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat ont démontré la biocompatibilité, la colonisation du patch par les cellules de l'hôte et l'absence d'effets délétères sur la fonction cardiaque. La modulation du degré d'acétylation semble également, par elle-même et sans ajout d'autres facteurs, améliorer la fonction cardiaque (étude en cours). L'obtention d'un patch modulable et biocompatible est donc possible à partir des hydrogels de chitosane et pourrait donc être utilisée comme transporteur de facteurs cardioprotecteurs. L'étape suivante pourrait donc consister à incorporer dans ces hydrogels différentes molécules, issues des cellules d'intérêt, qui pourraient avoir un effet bénéfique sur la fonction cardiaque.

Les différentes stratégies de thérapie cardiaque explorées ici démontrent bien l'inocuité et l'efficacité de la greffe épiscopordique sur la fonction cardiaque. Les pistes d'amélioration sont nombreuses et sont décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

Discussion et perspectives générales

1. Choix du modèle

L'objectif principal était avant tout de démontrer que les stratégies développées dans ce travail de thèse peuvent avoir un réel intérêt dans le domaine de la thérapie cellulaire cardiaque. Il s'agissait également de définir les effets physiologiques de ces approches dans le but de prédire leur efficacité pour une translation en clinique humaine. Cependant, la capacité des études précliniques à prédire de manière fiable l'effet qu'auront ces stratégies après implantation chez l'Homme reste encore très limitée et hasardeuse (Lafont et Faxon 1998). Il y a cependant des preuves que le choix avisé d'un modèle animal peut apporter de précieuses informations concernant la biodistribution, la migration et la persistance des cellules greffées, la faisabilité de l'approche ainsi que la détermination des facteurs de risque et de la sûreté du traitement (van der Spoel et al. 2012). Le choix du modèle d'étude est important, même s'il n'existe pas de consensus concernant ce choix pour les phases d'études précliniques. Les premières études ont cependant majoritairement été menées à l'aide de modèles murins permettant plus aisément de déterminer les mécanismes d'action du traitement, son innocuité et la présence/persistance des cellules dans le myocarde. Les modèles de gros animaux sont quant à eux plutôt utilisés dans un deuxième temps afin de vérifier les aspects d'efficacité, de dosage et les techniques d'administration utilisables. Cependant, ces modèles restent imparfaits. L'amélioration de la fonction cardiaque observée dans les modèles murins d'insuffisance cardiaque est souvent supérieure à celle observée dans des modèles de gros animaux qui est, à son tour, la plupart du temps supérieure à celle observée chez l'Homme. En effet, les modèles animaux sont souvent jeunes et exempts de facteurs de risques et de comorbidités associés à l'insuffisance cardiaque humaine. Chez l'Homme, viennent s'ajouter des paramètres tels que le style de vie, le tabagisme, l'alimentation, et l'accumulation de plusieurs pathologies associées qui peuvent entraîner des complications et la réduction des effets d'un traitement donné. Les animaux ont également, probablement, des capacités régénératives différentes de l'Homme. La recherche translationnelle permettant la transition du laboratoire de Recherche aux centres médicaux nécessite donc de prendre en compte le maximum de précautions (Lara-Pezzi et al. 2015).

Au sein des différentes études, nous avons principalement utilisé le modèle murin de cardiopathie dilatée induite par une invalidation conditionnelle du gène SRF. Comme décrit précédemment, ce modèle présente de nombreux avantages, notamment une bonne reproductibilité chronologique des symptômes. Cependant, l'invalidation du gène SRF dans les cardiomyocytes induit une pathologie qui se développe très rapidement et est irréversible, la mort de ces derniers étant inéluctable. Il est clair que les traitements testés (feuilles de cellules et patches en nanofibres de collagène) n'ont pas pour objectif le remplacement total des cardiomyocytes du cœur, puisque la pathologie ne peut que s'aggraver avec le temps. Cependant les biomatériaux ont permis de stabiliser, voire d'améliorer de manière significative, la

fonction cardiaque malgré la rapidité de dégénération cardiaque du modèle. Néanmoins, il est vrai que ce modèle reste assez éloigné de la réalité des pathologies humaines dont les mécanismes ne sont pas aussi drastiques et l'évolution plus lente. De plus il faut également noter que ce modèle est totalement immunocompétent. Malgré une immunomodulation par injection de ciclosporine A, il est fortement probable que les cellules greffées aient été rejetées plus ou moins rapidement. Pour améliorer ce modèle, il pourrait être intéressant de croiser ce modèle de cardiomyopathie dilatée avec un modèle immunodéprimé (souris RAG2-/-/gamma c-, Nude, ou NOD-Scid par exemple).

Le modèle d'infarctus du myocarde est un modèle qui évolue plus lentement que le modèle de cardiomyopathie dilatée par invalidation conditionnelle du gène SRF. Après l'occlusion vasculaire, la zone infarctée apparaît et la fonction baisse très rapidement. Cette période aiguë est suivie d'une période de stabilisation où la taille de l'infarctus varie très peu. Après plusieurs semaines, les processus d'adaptation s'essouffent et le remodelage devient délétère entraînant une insuffisance cardiaque terminale. Implantée durant la phase de stabilisation, la première formulation des hydrogels de chitosane n'a pas eu d'effet sur la fonction cardiaque mais cette étude a permis de démontrer l'innocuité et la biocompatibilité des hydrogels. Le modèle d'infarctus du myocarde obtenu par ligature de l'artère coronaire gauche descendante a été réalisé chez le rat car la visibilité vasculaire est meilleure que chez la souris (en lien direct avec la taille de l'animal). Etant donné que les hydrogels de chitosane ne sont pas cellularisés, aucune immunosuppression des animaux n'a été effectuée. L'objectif était en effet d'observer la réponse inflammatoire déclenchée par l'implantation.

2. Paramètres affectants la survie des cellules

a) Phénotype des cellules

Depuis quelques années les protocoles de différenciation cardiaque sont robustes et reproductibles. Il est maintenant relativement aisé d'obtenir des progéniteurs cardiaques ou cardiomyocytes battants à partir de cellules souches pluripotentes humaines. Cependant ces protocoles permettent d'obtenir un mélange de cellules cardiaques ayant un phénotype atrial, nodal ou ventriculaire. Le type de cellules cardiaques obtenues est pourtant d'une importance capitale pour la réussite des études de thérapies cellulaires cardiaques, principalement pour favoriser l'intégration électrique et la coordination des cellules greffées au tissu de l'hôte (Ng, Wong, et Tsang 2010). En effet, les différents types de cardiomyocytes ont des caractéristiques électriques spécifiques (potentiel d'action) qui peuvent défavoriser l'intégration électrique si ces cellules ne sont pas placées dans un contexte tissulaire compatible. Il existe des méthodes permettant l'obtention d'une population pure de cardiomyocytes ventriculaires, atriales ou nodales (Josowitz et al. 2014; Chen et al. 2016), cependant, ces méthodes nécessitent des modifications génétiques des cellules. Une étude comparant ces différents sous-types et leur efficacité dans le cadre

de la thérapie cellulaire cardiaque reste à mener. Une caractérisation phénotypique des cellules que nous avons utilisées pour ce travail pourrait être intéressante.

b) Maturation des cellules

Il faut noter que les cellules cardiaques obtenues, à partir de cellules souches pluripotentes, ont un stade de maturation qui est très similaire à celui des cardiomyocytes fœtaux en termes de capacité proliférative, de métabolisme et d'électrophysiologie. Cependant, à la différence des cardiomyocytes adultes primaires, elles peuvent être cultivées durant de longues périodes sans perdre leur phénotype contractile. Elles peuvent acquérir un phénotype plus mature avec un changement de morphologie, d'électrophysiologie et une perte de capacité proliférative (Robertson, Tran, et George 2013). Elles restent néanmoins différentes des cellules cardiaques adultes. L'équipe de Murry a bien démontré que des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines pouvaient s'intégrer au myocarde de primates et établir un couplage électrique avec les cellules hôtes (Chong et al. 2014). Cependant, l'apparition d'arythmies ventriculaires chez les sujets traités est attribuée à l'immatunité des cellules injectées. L'immatunité des cellules cardiaques utilisées en thérapie cellulaire semble être un facteur limitant. De la même manière, l'absence des cellules après la greffe lors de nos études pourrait être le fait d'une maturation insuffisante. Il est encore trop tôt pour affirmer que les cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes peuvent être suffisamment maturés pour mimer parfaitement les caractéristiques d'un cardiomyocyte adulte. Cependant, des protocoles de maturations permettent d'obtenir des cellules à un stade plus avancé, comme le traitement des cellules avec l'hormone thyroïde T3 (triiodothyronine) qui a des effets sur la contractilité, le métabolisme énergétique et les mitochondries (Yang et al. 2014). Des approches combinant des stimulations biologiques, électriques et mécaniques semblent être les plus prometteuses pour obtenir une maturation optimale de ces cellules. Une étude de thérapie cellulaire comparant des cardiomyocytes à différents stade de maturation pourrait nous éclairer concernant la meilleure stratégie à adopter pour choisir les meilleures cellules. L'organisation des cellules entre elles, plus proche du tissu myocardique, pourrait également influencer la maturation des cardiomyocytes. C'est pourquoi, nous avons tenté d'aligner les nanofibres au sein des matrices de collagène. Le développement des matrices de collagène est encore nécessaire avant d'obtenir des nanofibres parfaitement alignées.

c) Contribution des autre types cellulaires

Le cœur est un organe qui est constitué de plusieurs types cellulaires. En plus des cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales sont essentielles au bon fonctionnement du myocarde. Utiliser ces types cellulaires en association avec les cardiomyocytes pourrait, peut-être, permettre d'augmenter les survies des cellules greffées (Pfannkuche et al. 2010 ; Yuan et Ma 2014). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent qu'il est possible de cultiver des cellules endothéliales issues du sang de cordon (cellules CD31+) avec des cardiomyocytes dérivés des

cellules souches pluripotentes humaines. Un biomatériau ensemencé avec ces deux types cellulaires pourrait être plus efficace, les cellules endothéliales participant à l'angiogenèse et à la formation d'une vascularisation plus précoce dans le greffon améliorant ainsi la survie des cardiomyocytes.

d) Hypoxie

Les cellules greffées de manière épocardique sont placées dans une situation hypoxique alors qu'elles sont cultivées *in vitro* avec une haute concentration d'oxygène. Cette modification brutale pourrait également être à l'origine de leur mort. Des études ont montré que le pré-conditionnement de cellules à l'hypoxie améliore leur survie et le taux de prise de greffe (Dall et al. 2016). Mais cette stratégie n'a pas encore fait l'objet d'une évaluation clinique. Il est également possible d'envisager une stratégie différente en apportant, lors de la greffe, un transporteur d'oxygène comme la protéine recombinante HemoxCell® (Le Pape et al. 2015). Cette molécule permet le stockage et le relargage d'oxygène en milieu hypoxique. Elle pourrait ainsi être couplée au biomatériau utilisé pour améliorer la survie des cellules greffées. Cette stratégie est intéressante et a déjà démontré des résultats encourageant. En 2012, Li et ses collaborateurs ont utilisé un système d'encapsulation d'un transporteur d'oxygène et ont montré qu'il était possible d'améliorer le niveau d'oxygène pour des progéniteurs cardiaques (Li, Guo, et Guan 2012).

e) Facteurs mécaniques

Le cœur effectue plusieurs dizaines de contractions chaque minute (70 bpm chez l'Homme et 250 bpm chez la souris). Ces mouvements répétés peuvent être source de stress pour les cellules greffées au contact du myocarde. Ils peuvent ainsi induire la mort des cellules ou le décrochement de celles-ci de leur matrice. Afin de protéger les cellules de ce stress mécanique, nous avons tenté de coupler la matrice de collagène avec la fibrine afin de créer une couche protectrice de fibrine sur les cellules avant la greffe. Une telle approche a démontré des résultats encourageants. La fibrine étant un hydrogel, elle pourrait également être utilisée pour apporter des facteurs de survie aux cellules et contenir, par exemple, la molécule HemoxCell®.

3. Exosomes

De nombreuses études ont mis en évidence l'impact des voies paracrines sur l'effet biologique observé après la greffe d'un biomatériau. La communication paracrine entre le biomatériau et le myocarde de l'hôte est principalement médiée par les vésicules extracellulaires et notamment par les exosomes qui sont de petites vésicules de 30 à 100 nm de diamètre. Il a été démontré que les exosomes sont responsables des effets proangiogéniques et anti-apoptotiques des progéniteurs cardiaques implantés dans un modèle d'ischémie cardiaque (Barile et al. 2014). Les exosomes sont en fait des transporteurs de protéines, de molécules de signalisation et de régulateurs de la traduction comme les microARNs qui peuvent ainsi réguler des fonctions cellulaires (Emanuelli et al. 2015). Le contenu de ces exosomes dépend donc

de sa cellule d'origine et du contexte dans lequel la cellule se trouve. Par exemple, des exosomes issus de cellules souches transportent des facteurs protecteurs aux cellules cibles (Ailawadi et al. 2015). Les exosomes sont sécrétés de manière constitutive, mais un stress peut accroître leur production et leur relargage. La quantité et la qualité des exosomes dépendent de ce stress, ainsi l'obtention des particules nécessitent des conditions de culture contrôlées pour assurer la reproductibilité des résultats. Quelques équipes travaillent actuellement sur le remplacement, en thérapie cellulaire cardiaque, des cellules d'intérêt par les facteurs produits par ces mêmes cellules cultivées *in vitro*. Très récemment, l'équipe du Pr. Menasché a montré que l'injection intramyocardique de ces facteurs contenus dans des microvésicules extracellulaires ou exosomes, libérés par les cellules souches embryonnaires humaines, a permis l'amélioration de la fonction cardiaque de souris après un infarctus du myocarde (Kervadec et al. 2016).

Cependant, il est possible de se demander si cette stratégie, qui est basée sur la stimulation des voies de réparation endogènes, pourrait permettre une remuscularisation des tissus défailants, alors même qu'elle n'apporte pas de nouvelles cellules au myocarde. Cette question est, selon mon opinion, au cœur des récentes avancées dans le domaine de la thérapie cellulaire cardiaque.

Bibliographie

- Ailawadi, Shaina, Xiaohong Wang, Haitao Gu, et Guo-Chang Fan. 2015. « Pathologic Function and Therapeutic Potential of Exosomes in Cardiovascular Disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1852 (1): 1-11. doi:10.1016/j.bbadis.2014.10.008.
- Barile, Lucio, Vincenzo Lionetti, Elisabetta Cervio, Marco Matteucci, Mihaela Gherghiceanu, Laurentiu M. Popescu, Tiziano Torre, Francesco Siclari, Tiziano Moccetti, et Giuseppe Vassalli. 2014. « Extracellular Vesicles from Human Cardiac Progenitor Cells Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis and Improve Cardiac Function after Myocardial Infarction ». *Cardiovascular Research* 103 (4): 530-41. doi:10.1093/cvr/cvu167.
- Chen, Zhifen, Wenying Xian, Milena Bellin, Tatjana Dorn, Qinghai Tian, Alexander Goedel, Lisa Dreizehner, et al. 2016. « Subtype-Specific Promoter-Driven Action Potential Imaging for Precise Disease Modelling and Drug Testing in hiPSC-Derived Cardiomyocytes ». *European Heart Journal*, juin. doi:10.1093/eurheartj/ehw189.
- Chong, James J. H., Xiulan Yang, Creighton W. Don, Elina Minami, Yen-Wen Liu, Jill J. Weyers, William M. Mahoney, et al. 2014. « Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts ». *Nature* 510 (7504): 273-77. doi:10.1038/nature13233.
- Dall, Christopher, Mahmood Khan, Chun-An Chen, et Mark G. Angelos. 2016. « Oxygen Cycling to Improve Survival of Stem Cells for Myocardial Repair: A Review ». *Life Sciences* 153 (mai): 124-31. doi:10.1016/j.lfs.2016.04.011.
- Emanuelli, Costanza, Andrew I. U. Shearn, Gianni D. Angelini, et Susmita Sahoo. 2015. « Exosomes and Exosomal miRNAs in Cardiovascular Protection and Repair ». *Vascular Pharmacology* 71 (août): 24-30. doi:10.1016/j.vph.2015.02.008.
- Josowitz, Rebecca, Jia Lu, Christine Falce, Sunita L. D'Souza, Meng Wu, Ninette Cohen, Nicole C. Dubois, et al. 2014. « Identification and Purification of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial-like Cardiomyocytes Based on Sarcolipin Expression ». *PloS One* 9 (7): e101316. doi:10.1371/journal.pone.0101316.
- Kervadec, Anaïs, Valérie Bellamy, Nadia El Harane, Lousineh Arakélian, Valérie Vanneaux, Isabelle Cacciapuoti, Hany Nemetalla, et al. 2016. « Cardiovascular Progenitor-Derived Extracellular Vesicles Recapitulate the Beneficial Effects of Their Parent Cells in the Treatment of Chronic Heart Failure ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 35 (6): 795-807. doi:10.1016/j.healun.2016.01.013.
- Lafont, A., et D. Faxon. 1998. « Why Do Animal Models of Post-Angioplasty Restenosis Sometimes Poorly Predict the Outcome of Clinical Trials? ». *Cardiovascular Research* 39 (1): 50-59.
- Lara-Pezzi, Enrique, Philippe Menasché, Jean-Hugues Trouvin, Lina Badimón, John P. A. Ioannidis, Joseph C. Wu, Joseph A. Hill, et al. 2015. « Guidelines for Translational Research in Heart Failure ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 8 (1): 3-22. doi:10.1007/s12265-015-9606-8.
- Le Pape, Fiona, Morgane Bossard, Delphine Dutheil, Morgane Rousselot, Valérie Polard, Claude Férec, Elisabeth Leize, Pascal Delépine, et Franck Zal. 2015. « Advancement in Recombinant Protein Production Using a Marine Oxygen Carrier to Enhance Oxygen Transfer in a CHO-S Cell Line ». *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 43 (3): 186-95. doi:10.3109/21691401.2015.1029632.
- Li, Zhenqing, Xiaolei Guo, et Jianjun Guan. 2012. « An Oxygen Release System to Augment Cardiac Progenitor Cell Survival and Differentiation under Hypoxic Condition ». *Biomaterials* 33 (25): 5914-23. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.012.
- Ng, Sze Ying, Chun Kit Wong, et Suk Ying Tsang. 2010. « Differential Gene Expressions in Atrial and Ventricular Myocytes: Insights into the Road of Applying Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Future Therapies ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299 (6): C1234-1249. doi:10.1152/ajpcell.00402.2009.
- Pfannkuche, Kurt, Sabine Neuss, Frank Pillekamp, Lukas P. Frenzel, Wael Attia, Tobias Hannes, Jochen Salber, et al. 2010. « Fibroblasts Facilitate the Engraftment of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes on Three-Dimensional Collagen Matrices and Aggregation in Hanging Drops ». *Stem Cells and Development* 19 (10): 1589-99. doi:10.1089/scd.2009.0255.
- Robertson, Claire, David D. Tran, et Steven C. George. 2013. « Concise Review: Maturation Phases of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (5): 829-37. doi:10.1002/stem.1331.
- van der Spoel, Tycho I. G., Krijn R. Vrijsen, Stefan Koudstaal, Joost P. G. Sluijter, Johannes Frank W. Nijsen, Hugo W. de Jong, Imo E. Hofer, et al. 2012. « Transendocardial Cell Injection Is Not Superior to Intracoronary

- Infusion in a Porcine Model of Ischaemic Cardiomyopathy: A Study on Delivery Efficiency ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16 (11): 2768-76. doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01594.x.
- Yang, Xiulan, Marita Rodriguez, Lil Pabon, Karin A Fischer, Hans Reinecke, Michael Regnier, Nathan J. Sniadecki, Hannele Ruohola-Baker, et Charles E. Murry. 2014. « Tri-iodo-L-thyronine Promotes the Maturation of Human Cardiomyocytes-Derived from Induced Pluripotent Stem Cells ». *Journal of molecular and cellular cardiology* 72 (juillet): 296-304. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.04.005.
- Yuan, Ping, et Xin Ma. 2014. « Endothelial Cells Facilitate Cell-Based Cardiac Repair: Progress and Challenge ». *Current Stem Cell Research & Therapy* 9 (5): 415-23.

Annexe 1



Efficacy of epicardially delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy

Hadhami Hamdi^{1†}, Solène Emmanuelle Boitard^{2†}, Valérie Planat-Benard³, Julia Pouly⁴, Hany Neamatalla⁵, Pierre Joanne², Marie-Cécile Perier⁶, Valérie Bellamy¹, Louis Casteilla³, Zhenlin Li⁷, Albert Alain Hagège^{1,5}, Mathias Mericskay⁷, Philippe Menasché^{1,4*}, and Onnik Agbulut^{2*}

¹Inserm U633, Laboratory of Biosurgical Research, Paris, France; ²Unit of Functional and Adaptive Biology, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, CNRS EAC4413, 4 rue Marie Andrée Lagroua Weill-Hallé (case 7006), Paris 75013, France; ³UMR 5273 UPS, CNRS, EFS, Inserm U1031, STROMALab, Toulouse, France; ⁴Department of Cardiovascular Surgery, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 20 rue Leblanc, Paris 75015, France; ⁵Department of Cardiology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁶INSERM U970, Paris, France; and ⁷UPMC Sorbonne University Paris 6, UR4 Department of Aging, Stress & Inflammation, Paris, France

Received 8 February 2013; revised 17 May 2013; accepted 2 June 2013

Time for primary review: 21 days

Aims

Few studies have assessed the effects of cell therapy in non-ischaemic cardiomyopathies which, however, contribute to a large number of cardiac failures. Assuming that such conditions are best suited for a global delivery of cells, we assessed the effects of epicardially delivered adipose tissue-derived stroma cell (ADSC) sheets in a mouse model of dilated cardiomyopathy based on cardiac-specific and tamoxifen-inducible inactivation of serum response factor.

Methods and results

Three weeks after tamoxifen administration, the function of the left ventricle (LV) was assessed by echocardiography. Twenty-nine mice were then allocated to control ($n = 9$, non-transgenic), sham ($n = 10$, transgenic non-treated), and treated ($n = 10$, transgenic) groups. In the treated group, 3×10^6 allogeneic ADSCs were cultured for 2 days onto temperature-responsive polymers and the generated sheets were then transplanted over the surface of the heart. In 10 additional mice, the sheet was made of green fluorescent protein (GFP)-labelled ADSCs to track cell fate. Function, engraftment, and fibrosis were blindly assessed after 3 weeks. In the non-treated group, fractional shortening declined compared with baseline, whereas the sheet application resulted in its stabilization. This correlated with a lesser degree of LV remodelling, as LV end-diastolic and end-systolic diameters did not differ from baseline values. Many GFP⁺ cells were identified in the epicardial graft and in the myocardium. Treated animals also displayed a reduced expression of the stress-induced atrial natriuretic factor and beta-myosin heavy chain genes. These protective effects were also accompanied by a reduction of myocardial fibrosis.

Conclusion

These results strongly suggest the functional relevance of epicardially delivered cell-seeded biomaterials to non-ischaemic heart failure.

Keywords

Cardiomyopathy • Cell therapy • Stem cells • Remodelling • Fibrosis

1. Introduction

Dilated cardiomyopathy is the most common type of non-ischaemic cardiomyopathy and is characterized by dilatation and contractile dysfunction of the left (LV) and right ventricles leading to heart failure.¹ So far, few studies have assessed the effects of cell therapy in non-ischaemic cardiomyopathies which, however, contribute to a large number of

cardiac failures. The problem is clinically relevant because patients who have exhausted conventional medical therapies can only be offered invasive options like heart transplantation or destination therapy-targeted implantation of an assist device.² Thus, there is still a critical need for less invasive therapeutic strategies. In an effort to address this issue, we epicardially delivered adipose-derived stroma cell (ADSC) sheets in a mouse model of dilated cardiomyopathy.

[†] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel: +33 1 5727 7966 (O.A.)/+33 1 5609 3622 (P.M.); fax: +33 1 5727 7966 (O.A.)/+33 1 5609 3261 (P.M.); Email: onnik.agbulut@univ-paris-diderot.fr (O.A.)/philippe.menasche@egp.aphp.fr (P.M.).

Indeed, cell retention in damaged hearts appears as one of the major roadblocks to successful myocardial regeneration in stem cell therapy. The low rate of engraftment and high mortality of transplanted cells are initially caused by a mechanical leakage of cells³ and subsequently worsened by an interplay of biological factors that include inflammation, ischaemia due to poor vascularization of the injected areas, and apoptosis subsequent to detachment of anchorage-dependent cells.⁴ The emerging fields of tissue engineering and biomaterials for delivery and support of transplanted cells have begun to provide potential solutions for this obstacle. We recently supported this concept by demonstrating that epicardial delivery of ADSC sheets results in greater post-infarction survival, better engraftment, and better preservation of LV geometry than direct intramyocardial injections.⁵ This result was in keeping with those previously reported by several other studies which, however, were all relevant to ischaemic cardiomyopathies.^{6–8}

ADSCs were selected as the candidate cells because (i) they can be harvested and grown in a straightforward fashion and (ii) they secrete a wide array of angiogenic and anti-apoptotic factors,⁹ which likely account for their beneficial effects on perfusion and function in both small^{5,10} and large^{11,12} animal models of myocardial infarction. Given that this cell population has been mainly tested in models of ischaemic cardiomyopathy, the goal of the present study was to investigate the potential benefit of these cells in a mouse model of a non-ischaemic cardiomyopathy, focusing particularly on their engraftment as well as their potential to restore the functional capacity of the heart.

2. Methods

2.1 Animals

All procedures were approved by our institutional Ethics Committee and complied with the European legislation (Directive 2010/63/EU) on animal care. In this study, conditionally invalidated serum response factor (SRF) mice (α MHC-MerCreMer:Sf/Sf) were used as recipients.¹³ C57BL/6J (Janvier, France) and green fluorescent protein (GFP) transgenic mice¹⁴ were used as donors. The Cre-mediated excision of floxed SRF alleles in the heart was induced by daily intraperitoneal tamoxifen (20 μ g/g/day; Sigma-Aldrich, France) injections on 3 consecutive days (more details are available in the Supplementary material online). Transgenic C57BL/6J-GFP mice were kindly provided by Dr Okabe.¹⁴

2.2 Experimental groups and cell sheet transplantation

Thirty-nine 3-month-old mice were used in this study: α MHC-MerCreMer:Sf/Sf ($n = 30$) and Sf/Sf ($n = 9$). Tamoxifen was administered to all groups. Three weeks after tamoxifen administration, the animals were first anaesthetized with isoflurane (Baxter, France) for a baseline echocardiographical assessment and then allocated to control ($n = 9$, Sf/Sf mice), sham ($n = 10$, α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice), and treated ($n = 20$, α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice) groups. After baseline echocardiography, all animals underwent a left lateral thoracotomy after intraperitoneal ketamine (100 mg/kg; Merial, France)-xylazine (10 mg/kg; Bayer, Germany) anaesthesia and tracheal ventilation. Analgesia was performed for 2 days after surgery with a 10 mg/kg subcutaneous injection of ketoprofen (Merial). The treated group was subdivided into two subgroups, which underwent the epicardial deposition of either an ADSC sheet ($n = 10$) or of an ADSC-GFP sheet ($n = 10$) overlaying the left ventricle (LV). Sheets spontaneously stuck to the underlying epicardium without requirement for glue or suturing. All mice were daily treated with cyclosporine A (10 mg/kg/day, intraperitoneal; Novartis, France) until sacrifice. All animals were sacrificed at the end of experiment by cervical dislocation.

2.3 Assessment of LV function

Pre- and post-transplantation cardiac function was evaluated by transthoracic echocardiography (Sequoia 516, equipped with a 13 MHz phased-array linear 15L8 probe; Siemens, France) in animals sedated with 2% isoflurane. Two-dimensional parasternal long-axis views were used to measure the LV end-diastolic diameter (LVEDD) and end-systolic diameter (LVESD) in a time-motion mode. LV fractional shortening (LVFS) was calculated as $(LVEDD - LVESD) \times (100/LVEDD)$. All measurements were made online on freeze frames images in triplicate and averaged by an investigator blinded to the treatment group.

2.4 Isolation of ADSCs and preparation of cell sheets

ADSCs were isolated from both C57BL/6J and GFP¹⁴ mice from inguinal subcutaneous adipose tissues after intraperitoneal ketamine (100 mg/kg; Merial)-xylazine (10 mg/kg; Bayer) anaesthesia as described previously¹⁵ (more details are available in Supplementary material online). After isolation, animals were sacrificed by cervical dislocation. Cell sheets were formed by plating of 3×10^6 ADSCs (3.4×10^5 cells/cm²) onto thermo-responsive dishes (UpCell®; NalgeNunc International, USA) and kept at 37°C in an incubator for 2 days. Cell sheets were detached spontaneously at room temperature within 30 min, and then washed once with phosphate-buffered saline, thereby yielding a scaffold-free monolayered ADSC graft.

2.5 Characterization of ADSC sheets

2.5.1 Histological examination

ADSC sheets were fixed in 4% formalin overnight and embedded in paraffin. Five- μ m-thick sections were stained with haematoxylin–eosin. ADSC sheets obtained from the GFP transgenic mice were also examined using epifluorescence microscopy for GFP expression. Images were taken with an inverted microscope (Leica DMIL, Leica, Germany) equipped with a digital camera (Qicam, Qimaging, Canada).

2.5.2 Cytokine measurement using cytokine antibody arrays

The protein concentration was measured by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard. Cytokine antibody arrays were carried out according to the manufacturer's instructions (RayBiotech, USA) using 200 μ g of protein per sample. The intensity of the different spots was determined using a densitometric software (Multi Gauge, Fujifilm, France).

2.5.3 Quantitative cytokine measurement using ELISA

Quantitative analysis of the hepatocyte growth factor (HGF) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) secretion was measured using a mouse HGF and IGF-1 ELISA kit (RayBiotech) according to the manufacturer's instructions. Quantities of cytokines were expressed as pg of cytokine per mg of protein.

2.6 Histological and immunohistochemical assessment

After the last echocardiographical assessment and sacrifice, hearts were removed and separated in two halves by a short-axis section through the mid-portion of the heart. The blocks were immediately fixed in Tissue-Tek (Sakura, USA) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane until they were sliced into 8 μ m thick cryosections using an ultramicrotome. A total of 120 sections per heart were generated in the control, sham, and treated hearts. General morphology, fibrosis, angiogenesis, engraftment, and grafted cell characterization were performed as described in detail in Supplementary material online.

2.7 Relative quantification of gene expression by real-time PCR

Total RNA was extracted from the heart muscle using Qiazol[®], metallic beads and Tissue Lyser-II (Qiagen, France) following the manufacturer's instructions. The RNA quality for each sample was checked with Experion

RNA StdSens Analysis Kit and the Experion automated electrophoresis station (Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions. Only samples with an RNA quality indicator superior to 7 were used for further studies. Real-time PCR was performed using LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, France) as described in detail in Supplementary material online.

2.8 Statistics

Data are summarized using the mean \pm SD. Comparisons were performed across groups using analysis of variance or Kruskal–Wallis test with exact *P*-value when appropriate. Multiple comparisons were done using pairwise comparison with the Bonferroni correction for *post hoc* tests. Percentages of fibrosis and angiogenesis were compared between the groups using a mixed model analysis of variance considering the intra-mice correlation between measurements. For all analyses, a two-tailed *P*-value of <0.05 was considered as statistically significant. Analyses were conducted using SAS 9.3 (Statistical Analysis System, Cary, USA).

3. Results

3.1 Characterization of the ADSC sheets before delivery

The ADSC sheets detached spontaneously at room temperature, thereby yielding a scaffold-free monolayered ADSC graft (Figure 1A). As seen in Figure 1B, these sheets feature a 'carpet' of cells well connected with each other and surrounded by an abundant extracellular matrix (see arrowheads in Figure 1B). ADSC sheets featured the same morphological characteristic regardless of whether they were prepared from the GFP or C57BL/6J mice (Figure 1C). It should be noted that FACS analysis of ADSCs isolated from the GFP mice showed a heterogeneous population as only 50% of the cells expressed detectable levels of GFP (Figure 1C and D).

3.2 Engraftment and vascularization of ADSC sheets

Three weeks after their epicardial delivery, the ADSC sheets were macroscopically visualized on the surface of the heart (Figure 1E and F). For a closer analysis, 120 sections per heart were generated and some of these sections were stained with haematoxylin–eosin. As seen in Figure 1G and H, the majority (8 out of 10) of treated hearts displayed well-attached ADSC sheets on the LV wall. Furthermore, at this time point, numerous blood vessels were identified within the sheet area and in the underlying myocardium in close proximity to the sheet as evidenced by CD31 staining (Figure 1I and J). To visualize the grafted cells in the hearts, some of the ADSC sheets were made of GFP-labelled ADSCs. In those treated hearts, many GFP⁺ cells were identified within the grafted sheet (Figure 1K) and also in the myocardium (Figure 1L) suggesting that some of these cells had migrated to the depth of the myocardial wall. Using a semi-quantitative score (0: no cells; 1: minimal amount of cells; 2: moderate amount of cells; 3: large amount of cells), we found that among the 10 ADSC-GFP sheet-treated hearts, 3 were in the 0 (no cells) category, 3 qualified for score 1 while 4 were in the 2–3 (moderate or large number of cells) range. Some of these GFP⁺ cells expressed markers of the mesenchymal and endothelial lineages, demonstrated by their positive staining for vimentin and CD31, respectively. However, none of these GFP⁺ cells co-expressed cardiomyocyte-specific markers such as alpha-actinin, vinculin, and Nkx2.5 (data not shown).

3.3 Functional efficacy of epicardially delivered ADSC sheets

To avoid the possible confounding effects of GFP expression on functional and mechanistic analysis, ADSC sheets used for assessing these endpoints were made of non-labelled ADSCs. Three weeks (baseline) and 6 weeks (sacrifice) after tamoxifen administration, the function of the LV was assessed by echocardiography. LVFS was significantly decreased in the mutant mice at baseline compared with control animals ($P = 0.009$). At sacrifice, in the non-treated group, fractional shortening had declined compared with baseline (26 ± 7 vs. $17 \pm 5\%$, $P = 0.0005$), whereas the sheet application resulted in its stabilization (22 ± 5 vs. $22 \pm 4\%$, $P = 0.87$; Figure 2A). This correlated with a lesser degree of LV remodelling as LVEDD did not differ from baseline values (3.9 ± 0.3 vs. 4.1 ± 0.4 mm, $P = 0.33$), whereas it significantly increased in the non-treated group (3.9 ± 0.5 vs. 4.4 ± 0.6 mm, $P = 0.04$). As seen in Figure 2A, the changes in LVESD featured similar patterns.

The functional efficacy of epicardially delivered ADSC sheets was further supported by real-time PCR analysis, which demonstrated a reduced expression of the stress-induced beta-myosin heavy chain genes ($P = 0.005$), atrial natriuretic factor ($P = 0.009$), bone morphogenetic protein 4 ($P = 0.014$), and brain natriuretic peptide ($P = 0.082$) in the treated group compared with the non-treated one (Figure 2B).

3.4 Effects of epicardially delivered ADSC sheets on cardiac remodelling

To examine the impact of cell sheets on cardiac remodelling, we analysed cardiac fibrosis (Figure 3) in the non-GFP group only to again avoid the possible adverse effect of the label. The extent of fibrosis was first assessed by Sirius red staining. At sacrifice, all of the mutant mice presented extensive interstitial fibrosis. This result was also confirmed by immunostaining for vimentin, a marker of cardiac fibroblasts, which demonstrated a higher interstitial staining in mutant compared with the non-transgenic mice, as previously reported.¹⁶ However, despite the presence of extensive interstitial fibrosis in mutant mice, the mean percentage area of fibrosis was reduced in treated compared with non-treated mutant animals (21 ± 5 vs. $15 \pm 8\%$, $P = 0.02$; Figure 3A). Reduced fibrosis in the treated group in comparison with sham was also supported by real-time PCR, which demonstrated significant decreases in the ratio of collagen 1/collagen 3 (Figure 3B and C). As seen in Figure 3D and E, both transforming growth factor beta 1 and connective tissue growth factor mRNA levels were also decreased in treated compared with non-treated mice but the differences failed to reach a significant level.

Further assessment of the proliferative activity of cardiac fibroblasts was performed by co-immunostaining of Ki67, a cellular marker for proliferation, with vimentin (Figure 4). Proliferation of myocardial fibroblasts was a rare event in the control group (non-transgenic mice), whereas in the mutant mice the number of double-positive vimentin⁺-Ki67⁺ was increased by a factor of 5 (21.9 ± 5.5 vs. 4.1 ± 0.8 per mm², $P < 0.05$). However, the number of double-positive (Ki67⁺vimentin⁺) cells in treated animals was significantly decreased compared with the sham group (Figure 4).

As seen in Figure 4, there was a considerable number of Ki67⁺ cells, which did not express vimentin. To quantify and characterize this population, we performed additional immunostainings using resident stem cell, cardiomyocyte, or endothelial cell markers. None of the Ki67⁺ cells were co-labelled with cardiomyocyte or resident stem cell

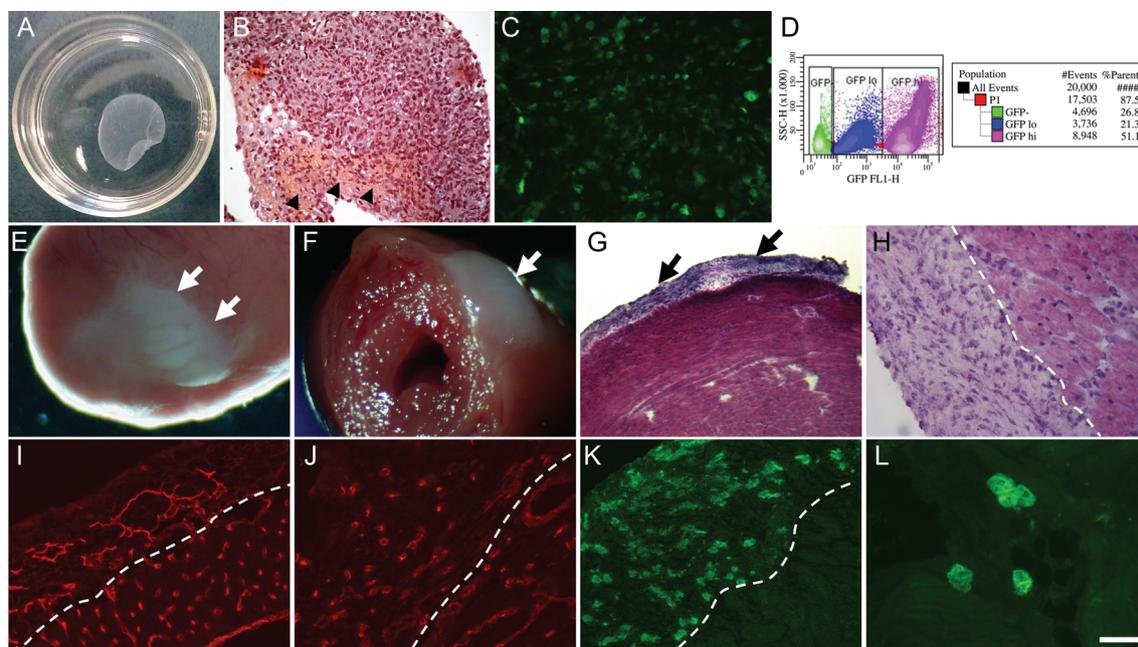


Figure 1 Characterization of the ADSC sheets before (A–D) and 3 weeks after epicardial delivery (E–L). ADSC sheets detached spontaneously at room temperature after 2 days of culture onto temperature-responsive surfaces, thereby yielding a scaffold-free monolayered cell sheet (A). Haematoxylin–eosin staining shows that the cell sheet represents a carpet of cells well interconnected with each other (B) and surrounded with an abundant extracellular matrix (see arrowheads in B). Some of the ADSC sheets were made of GFP-labelled ADSCs (C). Note that ADSCs isolated from the GFP transgenic mice showed a heterogeneous population (revealed by the FACS, D). Macroscopic visualization of epicardial-delivered ADSC sheets, 3 weeks after implantation (E and F). Haematoxylin–eosin staining demonstrated a perfect incorporation of the ADSC sheet to the surface of the heart (G and H). At this time, numerous capillaries were identified within the sheet area and in the underlying myocardium in close proximity to the sheet as evidenced by CD31 staining (I and J). Grafted cells were identified by GFP immunostaining. Many GFP⁺ cells were detected within the epicardial graft (K) and also in the myocardium (L). Arrows indicate the ADSC sheet. Dotted lines indicate the border between the ADSC sheet and heart. Bars: 7.5 mm (A); 200 μ m (B); 100 μ m (C); 1.3 mm (E and F); 120 μ m (G); 45 μ m (H); 40 μ m (I and L).

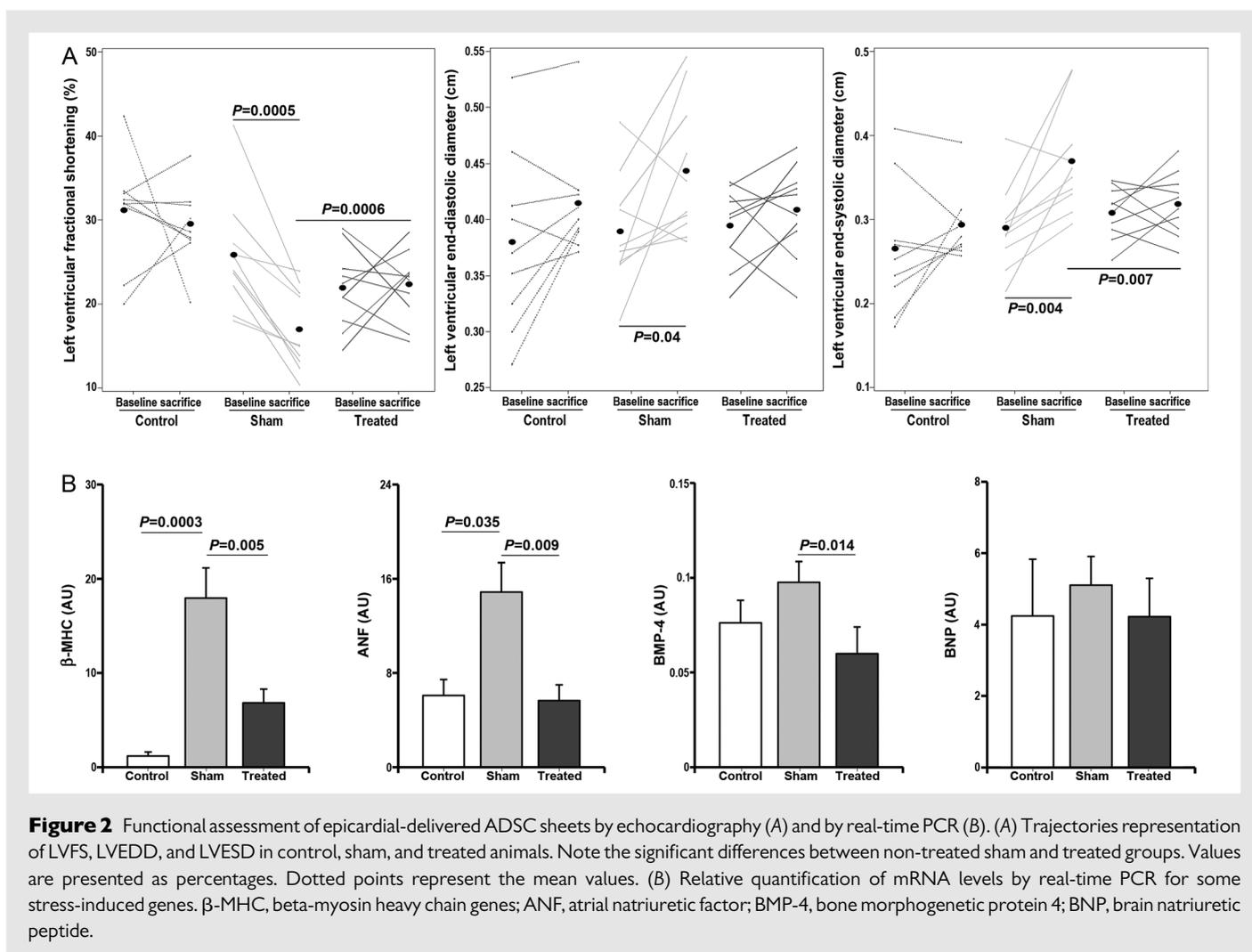
markers, whereas a majority of the Ki67⁺ cells is co-labelled with the endothelial cell marker CD31. However, no difference in the percentage of double-positive (Ki67⁺CD31⁺) cells was detected between the treated and non-treated groups (Figure 4). As we observed proliferative endothelial cells in both the treated and non-treated animals, we assessed the extent of angiogenesis. Our results demonstrate that the total capillary density within myocardial tissue was not significantly increased in treated compared with non-treated mice (3929 ± 441 vs. 3752 ± 656 per mm², $P = 0.48$).

To gain a mechanistic insight into the decrease of fibrosis in treated animals, we examined the cytokine expression profile of ADSC sheets using an antibody array. Our results demonstrated that the ADSC sheet, before delivery, expresses proangiogenic, anti-apoptotic, and/or anti-fibrotic cytokines such as vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor 1 alpha, stem cell factor, basic fibroblast growth factor, IGF-1, and P-selectin (data not shown). Of note, two cytokines known to possess a powerful anti-fibrotic activity, i.e. IGF-1 and HGF were found to be expressed in large amounts in the sheet before implantation (848 ± 202 and 160 ± 34 pg/mg, respectively), as assessed by ELISA. However, 3 weeks after transplantation, the myocardial tissue levels of these two cytokines failed to show significant differences between the treated and non-treated mice (data not shown).

4. Discussion

The major finding of this study is that epicardial delivery of an ADSC sheet improves the functional outcomes of non-ischaemically dilated mouse hearts and that this benefit is associated with a significant reduction of fibrosis.

Non-ischaemic dilated cardiomyopathy largely contributes to the number of patients with heart failure.¹ In contrast to ischaemic cardiomyopathies, which are amenable to a variety of pharmacological, electrical, and interventional treatments, the non-ischaemic forms of heart failure can only be treated by drugs and if the latter fail, the only remaining options entail heart transplantation or permanent implantation of an assist device, i.e. treatments which are both invasive and still fraught with several adverse effects.² There is thus a real need for developing novel therapies for non-ischaemic cardiomyopathies and cell therapy might be one of them. Nevertheless, this treatment has primarily been tested in ischaemic models, although some previous studies using skeletal myoblasts,^{17,18} bone marrow-derived cells,^{19,20} and embryonic stem cells^{21,22} in drug- or genetically induced cardiomyopathies have already provided preliminary evidence for the functional efficacy of cell transplantation in these settings. The present study further supports these data by showing that ADSCs can stabilize the contractile function of SRF-deficient transgenic mice while reducing the extent of ventricular

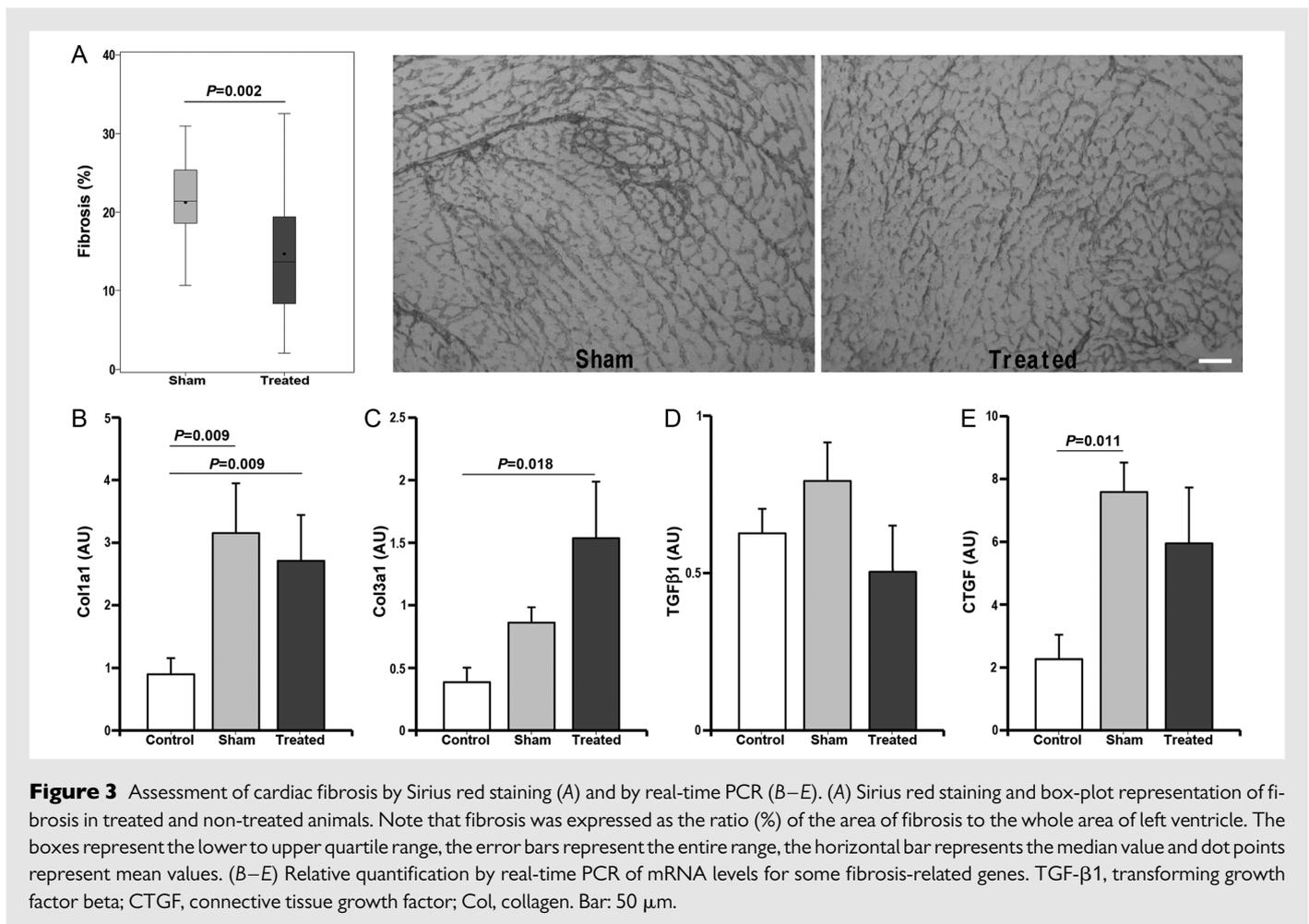


dilation. SRF, an MADS-box transcription factor regulates the expression of genes involved in growth, proliferation, differentiation, and the actin cytoskeleton. An abnormal truncated form of SRF has been found in human failing hearts²³ and the cleavage of SRF by caspase may promote heart failure.²⁴ Conditional invalidation of SRF using the Cre/LoxP strategy in heart demonstrates that SRF is crucial for cardiac differentiation and maturation during embryogenesis and the postnatal period.^{25,26} In our study, we used a double transgenic mouse model which allows to induce the inactivation of SRF only in cardiomyocytes as tamoxifen-inducible Cre recombinase expression is under the control of the cardiomyocyte-specific alpha myosin heavy chain promoter.¹³ As early as 5 days after tamoxifen injection there is a marked decrease in SRF mRNA and protein levels; mice then exhibit a progressive impairment of cardiac function, with reduced energy flux to the myofibril and decreased contractility, ending up in dilated cardiomyopathy, heart failure, and death within 10 weeks.^{13–27} To the best of our knowledge, it is the first time that cell therapy is assessed in this model which features, among others, the advantage of a timely controlled onset of functional deterioration (once tamoxifen has been given), thereby allowing a standardized comparison of outcomes between treated and non-treated mutant animals.

Mechanistically, our data support the commonly accepted view that transplanted cells primarily act through paracrine signalling.²⁸ Indeed,

none of the grafted cells which could be identified co-expressed cardiac-specific markers, thereby ruling out any ‘regeneration’ of the diseased myocardium from the donor cells. Conversely, both the antibody array and ELISA data consistently demonstrated the expression of a wide spectrum of angiogenic and anti-fibrotic biomolecules released by the ADSC, in keeping with the previously published data.⁹ In addition, the quantification of HGF and IGF-1 using ELISA showed that ADSC sheets at the time of implantation expressed large amounts of IGF-1 and HGF, both known for their anti-fibrotic activity.^{16,29} Although the myocardial tissue levels of these cytokines did not differ 3 weeks after transplantation, their possible effect at an earlier time point is suggested by the reduced proliferation of fibroblasts seen in the sheet-treated group. It is thus tempting to speculate that altogether, these data account for the reduction in fibrosis which, in turn, might have favourably influenced the preservation of ventricular geometry and function.

Another type of cells which acts paracrinally is the skeletal myoblast.³⁰ To determine whether skeletal myoblast sheets would have the same effect in our model of non-ischaemic cardiomyopathy, we assessed these constructs in an exploratory study and found that 3 weeks after the procedure, epicardially delivered skeletal myoblast sheets were functionally less effective than the ADSC ones, as demonstrated by a decrease in LVFS compared with baseline (23.5 ± 5.0 vs. 26.1 ± 4.8 , $n = 7$). This result further highlights the therapeutic potential of



ADSC sheets in non-ischaeemically dilated mouse hearts. Indeed, if one assumes that the grafted cells do not differentiate in new cardiomyocytes (unless cardiac-committed cells are used) but will primarily act as bio-factories releasing cardioprotective mediators, the choice of mesenchymal stem cells is clinically appealing because these cells are easily scalable, feature a rich secretome, and are credited for some immune privilege which could then allow their temporary persistence in the grafted tissue after an allotransplantation. While mesenchymal stem cells can be harvested from different tissue sources, retrieval of cells from the adipose tissue may have the advantage of a lesser degree of invasiveness compared with iliac crest puncture for bone marrow collection. Indeed, several studies have now demonstrated the functional benefits of ADSCs in ischaemic small^{5,10} and large^{11,12} animal models and clinical trials are currently underway to test these cells in the context of both acute and chronic ischaemic heart diseases. However, even if the initial goal of myocardial regeneration by permanent structural integration of the grafted cells in the recipient heart tends now to shift towards a transient paracrine activation of endogenous pathways by these cells, it still remains mandatory that, for being efficacious, cells remain engrafted for a sufficient period of time. So far, however, the expected efficacy of cardiac cell therapy has been hampered by the low rate of sustained engraftment resulting from both massive mechanical leakage at the time of cell delivery and subsequent cell death because of the intermingled effects of ischaemia, inflammation, apoptosis, and eventually rejection.^{3,4} There is thus a critical need for improved methods of cell delivery and, from this standpoint, the use of the cell sheet technology features

distinct advantages, which include the avoidance of cell damage induced by their pre-implantation proteolytic dissociation when they are injected by a conventional needle-based technique, maintenance of cell cohesiveness through their anchoring to a self-secreted extracellular matrix, an attendant increase in cell survival, the lack of foreign supporting materials, and the simplicity of their application provided one has a direct control over the surface of the heart. Previous studies have now established the superiority of these cell sheets over conventional needle-based injections in various animal models and with a wide variety of cell phenotypes^{5–8} and the global nature of the disease in non-ischaeemic cardiomyopathies makes ‘wrapping’ of the heart by these sheets particularly sound. Our data support this view by showing that 3 weeks after the epicardial delivery of the sheets, cells could still be identified, both at the surface of the heart and to a lesser extent in the underlying myocardium, whereas, at this time point, most studies using injections already fail to show any residual cell engraftment. Even though cells making up the sheet ultimately disappear, this loss occurs gradually over time and it is thus sound to postulate that, in the present study, the cell sheet allowed the cells to persist long enough to release the factors that activated the host-associated signalling pathways and harnessed endogenous repair mechanisms accounting for the observed cardioprotective effects.

In conclusion, the present study supports the efficacy of an epicardial coverage by an ADSC-based sheet in a genetically induced model of non-ischaeemic dilated cardiomyopathy. It is fair, however, to acknowledge that handling of these fragile sheets may not always be straightforward.

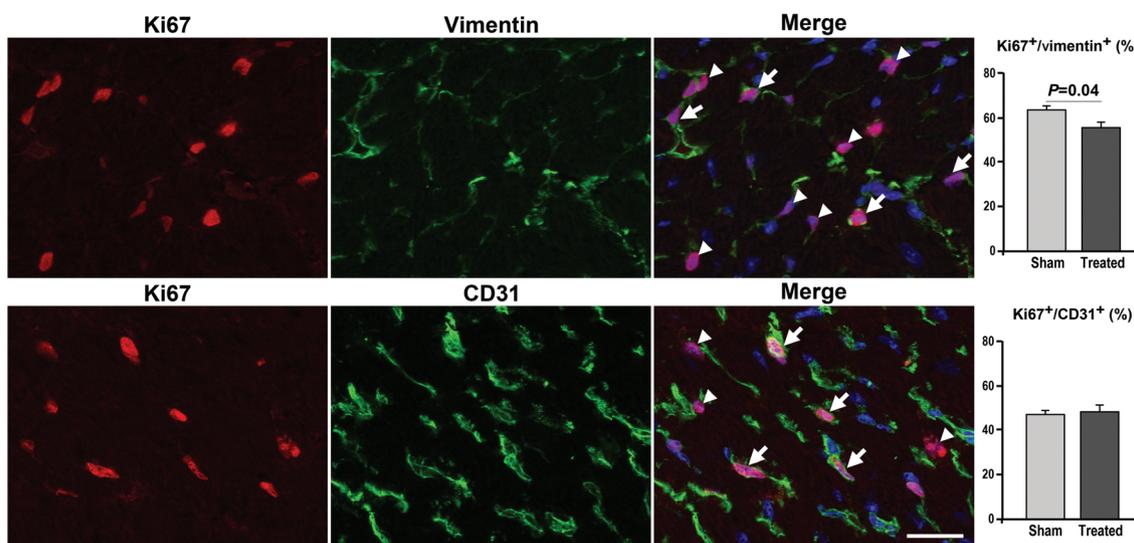


Figure 4 Characterization of proliferative interstitial cells in the treated mice myocardium. Three weeks after epicardial delivery of the ADSC sheet, the heart sections were co-stained with the antibodies against the cell-proliferation-associated antigen-Ki67 (red fluorescence) and either vimentin (upper panel, green fluorescence) or CD31 (lower panel, green fluorescence). Combined red and green fluorescence and DAPI-stained nuclei (blue) are shown in merged images. Arrows indicate co-stained cells; arrowheads indicate cells only labelled for Ki67. Ki67⁺ cells were counted manually in whole heart sections and the results are expressed as mean \pm SD. Bar: 25 μ m.

These data should thus be considered primarily as proof-of-concept that 'wrapping' diseased areas of the myocardium in non-ischaemic dilated cardiomyopathies may be an efficacious therapy even though it might be more user-friendly to replace the cell sheet by a more mechanically robust biocompatible scaffold, of which many are yet available. Likewise, alternate cells, particularly those featuring a force-generating capacity and appropriately patterned onto engineered constructs³¹ could also be considered. The clinical applicability of this approach might be facilitated by newly developed thoracoscopic approaches allowing access to the surface of the heart through minimally invasive procedures.³²

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Teruo Okano, Dr Tatsuya Shimizu, and Dr Atsuhiko Saito for having trained our group in cell sheet technology and Nathalie Vadrot for her technical assistance.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by INSERM, by the Fondation de l'Avenir (grant number ET9-547), Agence de la Biomédecine, by the Fondation Desmarests, the LeDucq Foundation (SHAPEHEART network 11 CVD 02), Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-RPIB-015), and by the LabEx_REVIVE (ANR-10-LABX-73). H.H. was supported by fellowships from the Agence Universitaire de la Francophonie, the Fondation BNP Paribas, and the Fondation LeDucq (SHAPEHEART network). P.J. was supported by a fellowship from the Conseil Régional d'Île de France (DIM STEM-Pôle).

References

- Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet Med* 2010;**12**:655–667.
- Clegg AJ, Scott DA, Loveman E, Colquitt JL, Royle P, Bryant J. Clinical and cost-effectiveness of left ventricular assist devices as a bridge to heart transplantation for people with end-stage heart failure: a systematic review and economic evaluation. *Eur Heart J* 2006;**27**:2929–2938.
- Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA. Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:301–307.
- Smets FN, Chen Y, Wang L-J, Soriano HE. Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 2002;**75**:344–352.
- Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, Puymirat E, Geha R, Pidial L *et al*. Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections. *Cardiovasc Res* 2011;**91**:483–491.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H *et al*. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;**12**:459–465.
- Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, Bel A, Puymirat E, Peyrard S *et al*. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg* 2009;**87**:1196–1203.
- Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T *et al*. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 2012;**126**:S29–S37.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE *et al*. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;**109**:1292–1298.
- Mazo M, Planat-Bénard V, Abizanda G, Pelacho B, Léobon B, Gavira JJ *et al*. Transplantation of adipose-derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2008;**10**:454–462.
- Valina C, Pinkernell K, Song Y-H, Bai X, Sadat S, Campeau RJ *et al*. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;**28**:2667–2677.
- Mazo M, Hernández S, Gavira JJ, Abizanda G, Araña M, López-Martínez T *et al*. Treatment of reperfused ischemia with adipose-derived stem cells in a preclinical swine model of myocardial infarction. *Cell transplantation* 2012;**21**:2723–2733.
- Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G *et al*. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation* 2005;**112**:2930–2939.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;**407**:313–319.

15. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibelink M, Tamarat R et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;**109**:656–663.
16. Touvron M, Escoubet B, Mericskay M, Angelini A, Lamotte L, Santini MP et al. Locally expressed IGF1 propeptide improves mouse heart function in induced dilated cardiomyopathy by blocking myocardial fibrosis and SRF-dependent CTGF induction. *Dis Model Mech* 2012;**5**:481–491.
17. Suzuki K, Murtuza B, Suzuki N, Smolenski RT, Yacoub MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation* 2001;**104**:I213–I217.
18. Pouly J, Hagège AA, Vilquin J-T, Bissery A, Rouche A, Bruneval P et al. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation* 2004;**110**:1626–1631.
19. Agbulut O, Menot M-L, Li Z, Marotte F, Paulin D, Hagège AA et al. Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:451–459.
20. Chen Y, Liu W, Li W, Gao C. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* 2010;**88**:311–315.
21. Yamada S, Nelson TJ, Crespo-Diaz RJ, Perez-Terzic C, Liu X-K, Miki T et al. Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy. *Stem Cells* 2008;**26**:2644–2653.
22. Singla DK, Ahmed A, Singla R, Yan B. Embryonic Stem Cells Improve Cardiac Function in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Mediated through Multiple Mechanisms. *Cell Transplant* 2012;**21**:1919–1930.
23. Davis FJ, Gupta M, Pogwizd SM, Bacha E, Jeevanandam V, Gupta MP. Increased expression of alternatively spliced dominant-negative isoform of SRF in human failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**282**:H1521–H1533.
24. Chang J, Wei L, Otani T, Youker KA, Entman ML, Schwartz RJ. Inhibitory cardiac transcription factor, SRF-N, is generated by caspase 3 cleavage in human heart failure and attenuated by ventricular unloading. *Circulation* 2003;**108**:407–413.
25. Parlakian A, Tuil D, Hamard G, Tavernier G, Hentzen D, Concordet J-P et al. Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:5281–5289.
26. Gary-Bobo G, Parlakian A, Escoubet B, Franco CA, Clément S, Bruneval P et al. Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008;**10**:635–645.
27. Digue N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E et al. Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2011;**286**:35007–35019.
28. Maltais S, Tremblay JP, Perrault LP, Ly HQ. The paracrine effect: pivotal mechanism in cell-based cardiac repair. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;**3**:652–662.
29. Okayama K, Azuma J, Dosaka N, Iekushi K, Sanada F, Kusunoki H et al. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial–mesenchymal transition. *Hypertension* 2012;**59**:958–965.
30. Perez-Ilzarbe M, Agbulut O, Pelacho B, Ciorba C, San Jose-Eneriz E, Desnos M et al. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur J Heart Fail* 2008;**10**:1065–1072.
31. Zhang D, Shadrin IY, Lam J, Xian HQ, Snodgrass HR, Bursac N. Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 2013;**34**:5813–5820. S0142-9612(13)00470-5.
32. Kimura T, Miyoshi S, Takatsuki S, Tanimoto K, Fukumoto K, Soejima K et al. Safety and efficacy of pericardial endoscopy by percutaneous subxyphoid approach in swine heart in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;**142**:181–190.

Annexe 2

ORIGINAL PRE-CLINICAL SCIENCE

Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold



Valérie Bellamy, MSc,^a Valérie Vanneau, MD, PhD,^b Alain Bel, MD,^{a,c}
Hany Nemetalla, MD,^{a,d} Solène Emmanuelle Boitard, MSc,^e
Yohan Farouz, PhD,^a Pierre Joanne, PhD,^e Marie-Cécile Perier, MD,^a
Estelle Robidel,^a Chantal Mandet,^a Albert Hagège, MD, PhD,^{a,d}
Patrick Bruneval, MD, PhD,^{a,f} Jérôme Larghero, MD, PhD,^b
Onnik Agbulut, PhD,^e and Philippe Menasché, MD, PhD^{a,c}

From the ^aINSERM U970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; ^bAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Cell Therapy Unit and Clinical Investigation Center in Biotherapies (CBT501), INSERM UMR1160, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ^cAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiovascular Surgery, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ^dAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiology, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ^eSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IBPS, UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, Paris, France; and the ^fAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Pathology, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

KEYWORDS:

stem cells;
heart failure;
tissue engineering;
cardiac progenitors;
cell transplantation;
embryonic stem cells;
cardiac patches

BACKGROUND: Cardiac-committed cells and biomimetic scaffolds independently improve the therapeutic efficacy of stem cells. In this study we tested the long-term effects of their combination.

METHODS: Eighty immune-deficient rats underwent permanent coronary artery ligation. Five to 7 weeks later, those with an echocardiographically measured ejection fraction (EF) $\leq 55\%$ were re-operated on and randomly allocated to receive a cell-free fibrin patch ($n = 25$), a fibrin patch loaded with 700,000 human embryonic stem cells (ESC) pre-treated to promote early cardiac differentiation (SSEA-1⁺ progenitors [$n = 30$]), or to serve as sham-operated animals ($n = 25$). Left ventricular function was assessed by echocardiography at baseline and every month thereafter until 4 months. Hearts were then processed for assessment of fibrosis and angiogenesis and a 5-component heart failure score was constructed by integrating the absolute change in left ventricular end-systolic volume (LVESV) between 4 months and baseline, and the quantitative polymerase chain reaction (qPCR)-based expression of natriuretic peptides A and B, myosin heavy chain 7 and periostin. All data were recorded and analyzed in a blinded manner.

RESULTS: The cell-treated group consistently yielded better functional outcomes than the sham-operated group ($p = 0.002$ for EF; $p = 0.01$ for LVESV). Angiogenesis in the border zone was also significantly greater in the cell-fibrin group ($p = 0.006$), which yielded the lowest heart failure score ($p = 0.04$ vs sham). Engrafted progenitors were only detected shortly after transplantation; no grafted cells were identified after 4 months. There was no teratoma identified.

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

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

CONCLUSIONS: A fibrin scaffold loaded with ESC-derived cardiac progenitors resulted in sustained improvement in contractility and attenuation of remodeling without sustained donor cell engraftment. A paracrine effect, possibly on innate reparative responses, is a possible mechanism for this enduring effect. *J Heart Lung Transplant* 2015;34:1198–1207

© 2015 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

At least two important lessons can be drawn from the multiple cardiac stem cell therapies reported so far. The first is that, regardless of whether the transplanted cells directly generate new myocardial tissue or, more likely, act by harnessing endogenous repair pathways to induce host-derived regeneration,¹ the most effective cells seem to be those committed to a cardiac lineage.^{2,3} In this setting, along with mesenchymal stem cells exposed to a cocktail of cardiopoietic factors before transplantation⁴ and cardiospheres,⁵ pluripotent stem cells are attractive because of their intrinsic capacity to be differentiated in any lineage, including the cardiomyogenic one, in response to appropriate cues.⁶ The second important lesson is that conventional needle-based intramyocardial injections have several limitations, including random distribution of cells, stress-induced cell damage⁷ and, possibly, induction of arrhythmias.^{8,9}

Because cardiac surgery provides the unique opportunity for direct control over the heart, several studies have assessed the effects of replacing multiple intramyocardial injections by the epicardial delivery of a cellularized patch. Overall, those results support the superiority of the latter approach with regard to cell survival,^{10–13} reduction of fibrosis,^{12–14} increased angiogenesis^{12–14} and improved function.^{10,12–15} Additional advantages of the patch-based approach include strengthening of the infarcted wall, which may contribute to limiting adverse remodeling¹⁶ and provision of a template for cells to proliferate and secrete their own matrix to which they can anchor.¹⁵ Among the diverse materials that can be used, fibrin is attractive due to its biocompatibility, suitability for cell adhesion,¹⁷ potential to act as a reservoir for controlled-release growth factors,¹⁸ and a long-standing safety record when used as an hemostatic sealant in surgery.¹⁹

The present study was therefore designed to leverage these data by combining the use of human embryonic stem cell (ESC)-derived cardiac progenitors with their incorporation into a fibrin scaffold. We further aimed to assess the outcome of such a composite construct in a rat model of myocardial infarction subjected to a serial and extended (4 months) functional follow-up.

Methods

Animals

Eighty female nude rats (Charles River), weighing an average of 200 to 250 g, were used in this study. All procedures were approved by our institutional ethics committee and complied with European legislation (European Commission Directive 86/609/EEC) on animal care.

Experimental protocol

Myocardial infarction was created as described previously.¹⁴ Five to 7 weeks after myocardial infarction, rats underwent a baseline echocardiographic assessment of left ventricular (LV) function, and all those with an ejection fraction (EF) $\geq 55\%$ were excluded. The remaining rats were re-operated on by a median sternotomy and randomly allocated to receive a cell-free fibrin patch ($n = 25$) or a fibrin patch loaded with 700,000 ESC-derived SSEA-1⁺ progenitors ($n = 30$). The patch was delivered onto the clearly visible akinetic area and secured to the epicardium by three 6/0 polypropylene sutures. Twenty-five additional rats assigned to a sham group only underwent open-chest placement of similar sutures, without any other procedure. No medical treatment for heart failure was given. Three additional rats receiving a progenitor cell-loaded fibrin patch were used for early post-transplant (1, 2 and 7 days) histologic assessment.

Preparation of SSEA-1⁺ progenitors

The progenitors were derived from the I6 ESC line (generously provided by J. Itskovitz and M. Amit, Technion Institute, Haifa, Israel), according to a relatively simple growth factor-based protocol attempting to recapitulate signaling events involved in embryonic cardiogenesis^{20–22} (refer to Supplementary Material available online at www.jhltonline.org/). This protocol allowed for reproducibly generating a population of SSEA-1⁺ early cardiac progenitors, primarily expressing *Isl-1*, a transcription factor for both the first and second heart fields,²³ but also additional genes characteristic of different developmental stages of cardiogenesis.²⁴ The cardiomyocyte-oriented fate of this population has been confirmed in vivo in a non-human primate model of myocardial infarction.²⁵

Preparation of the fibrin patch

Seven-hundred thousand SSEA-1⁺ progenitors were first added to 150 μ l of a solution composed of fibrinogen (20 mg/ml) and alpha-minimal essential medium (α -MEM) (Macopharma, Tourcoing, France) in an agarose-coated Petri dish. Four units of thrombin were then added as evenly distributed 25- μ l droplets of an equivalent volume of culture medium supplemented with thrombin to induce polymerization of the gel, which occurred in < 10 minutes (at 37°C). Both fibrinogen and thrombin were components of the Evicel kit (Ethicon Biosurgery, Omrix Biopharmaceuticals-Ethicon Biosurgery, Rhode Saint Genèse, Belgium). Previous laboratory studies have shown that this fibrinogen-thrombin ratio is appropriate to generate mechanically robust patches with good handling and suturability characteristics and well-preserved cell viability.

Assessment of LV function

LV function was assessed by echocardiography at baseline and every month thereafter until killing at 4 months, as described previously¹⁴ (refer to [Supplementary Material online](#)).

Histologic and immunohistochemical analyses

Four months after the sham or transplantation procedures, rats were euthanized and killed. Explanted hearts were processed for the determination of fibrosis and angiogenesis. In separate experiments, tracking of cell fate was performed 1 day and 1 week after transplantation using immunostaining against lamin A/C (refer to [Supplementary Material online](#)) and completed, at 4 months only, by search for human-specific Alu sequences using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Relative quantification of gene expression by real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from heart tissue samples using TRIzol lysis reagent (Life Technologies, Saint-Aubin, France) and TissueLyser II system (Qiagen France SAS, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR (LightCycler 480; Roche Diagnostics, France) was performed as described in the [Supplementary Material online](#).

Assessment of heart failure index

In 20 randomly selected hearts ($n = 7$, 7 and 6 for sham-operated, control acellular fibrin patches and cell-treated patches, respectively), a whole set of functional and PCR data were available. This cohort was therefore used for generating a 5-component heart failure score, including the absolute change in LV end-systolic volume (ESV) between 4 months and baseline, and the quantitative PCR (qPCR)-based expression of natriuretic peptides A and B, myosin heavy chain 7 and periostin.

Statistics

Data are summarized using mean (95% confidence interval) or mean (SEM) values. Survival between groups was compared using the log-rank test and Kaplan-Meier curves were plotted. Within each group, LV function variables measured at baseline and at 4 months were compared using paired Student's *t*-tests.

Across groups, the changes in LV function variables between repeated assessment (baseline and 1, 2, 3 and 4 months) were compared using a linear mixed model analysis. The mean percentages of fibrosis and angiogenesis were compared between groups using analysis of variance (ANOVA). Pairwise comparisons were done and *p*-values were adjusted for multiple testing (Tukey's adjustment). The "heart failure index" was constructed by standardizing the 5 components on the overall population (i.e., computing *z*-score for each variable) and then averaging them. Comparisons of this index between groups were made using ANOVA (Tukey's adjustment for multiple testing). For all analyses, $p < 0.05$ (2-tailed) was considered statistically significant.

Analyses were conducted using SAS, version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Characteristics of transplanted SSEA-1⁺ cell population

After immunomagnetic sorting, the purity rate of the SSEA-1⁺ cell population was $92.5 \pm 2.6\%$. The transcriptomic

profiling of this population, as assessed by AffyMetrix microarray analysis, showed the down-regulation of pluripotency-associated genes, such as *SOX2*, *SOX21*, *NANOG*, *HESX1*, *LEFTY* and *ZIC3* ([Figure 1A](#)), as compared with undifferentiated I6 ESC. This pattern was mirrored by the upregulation of cardiac mesoderm-committed genes, such as *HAND1*, *ISL1*, *EOMES*, *HAPLN1*, *BMP4* and *PKP2* ([Figure 1B](#)). Based on that same transcriptomic analysis, the SSEA-1⁻ cell fraction was also characterized by a switch-off of most pluripotency genes ([Figure 1A](#)).

Four hours after sorting, a time-point selected to match the timing by which the patch would be effectively delivered onto the heart, <10% of the SSEA-1⁺ scaffold-embedded cells were found apoptotic, as shown by TUNEL staining and caspase-3 expression (data not shown), while markers suggestive of a cardiomyogenic lineage, such as *Isl-1*, were identified ([Figure 2](#), upper panel). Moreover, the ability of the SSEA-1⁺ cells to keep proliferating into the fibrin scaffold was demonstrated by Ki67 staining ([Figure 2](#), lower panel).

LV function assessment

After exclusion of rats with preserved LV function (LVEF $\geq 55\%$), baseline LVEF did not differ between the three groups (47.46% [95% confidence interval 45.28% to 49.63%], 47.68% [45.96% to 49.40%] and 47.37% [44.97% to 49.77%] in sham-operated [$n = 18$], control [$n = 19$] and treated [$n = 20$] hearts, respectively). Over the 4-month follow-up period, the death rate did not differ significantly among the three groups (12, 13 and 14 deaths in the sham, control and treated groups, respectively; [Figure 3A](#)), which left a total of 41 surviving animals (13 sham-operated rats, 12 controls and 16 treated rats) meeting the pre-set inclusion criterion (LVEF $\leq 55\%$) available for the last 4-month echocardiographic assessment.

Over this 4-month follow-up period, the patterns of changes remained fairly consistent within each group ([Figure 3B](#)). Function remained stable in the sham group in which the LVEF, at 4 months, was 48.45% (44.71% to 52.18%); it increased slightly in the control acellular fibrin group (50.36% [47.29% to 53.42%]) and to a still greater extent in the cell-treated group (53.19% [50.10% to 56.29%], $p = 0.002$ vs sham). When data were expressed as absolute difference between the baseline value and the 4-month final study point, LVEF was found to have increased by $0.09 \pm 0.99\%$ (mean \pm SEM) in sham-operated hearts, $2.36 \pm 0.80\%$ in control cell-free fibrin-treated hearts ($p = 0.014$ vs baseline) and $5.68 \pm 1.29\%$ in cell+fibrin-treated hearts ($p = 0.0005$ vs baseline).

LV end-diastolic volume (LVEDV) data were likewise similar at baseline between the three groups at 344.81 μ l (95% confidence interval 319.38 to 370.23), 365.12 μ l (328.88 to 401.35) and 357.63 μ l (323.89 to 391.37) in sham, control and treated hearts, respectively. However, the patterns of changes were then markedly different ([Figure 3C](#)). Volumes steadily increased to a similar extent

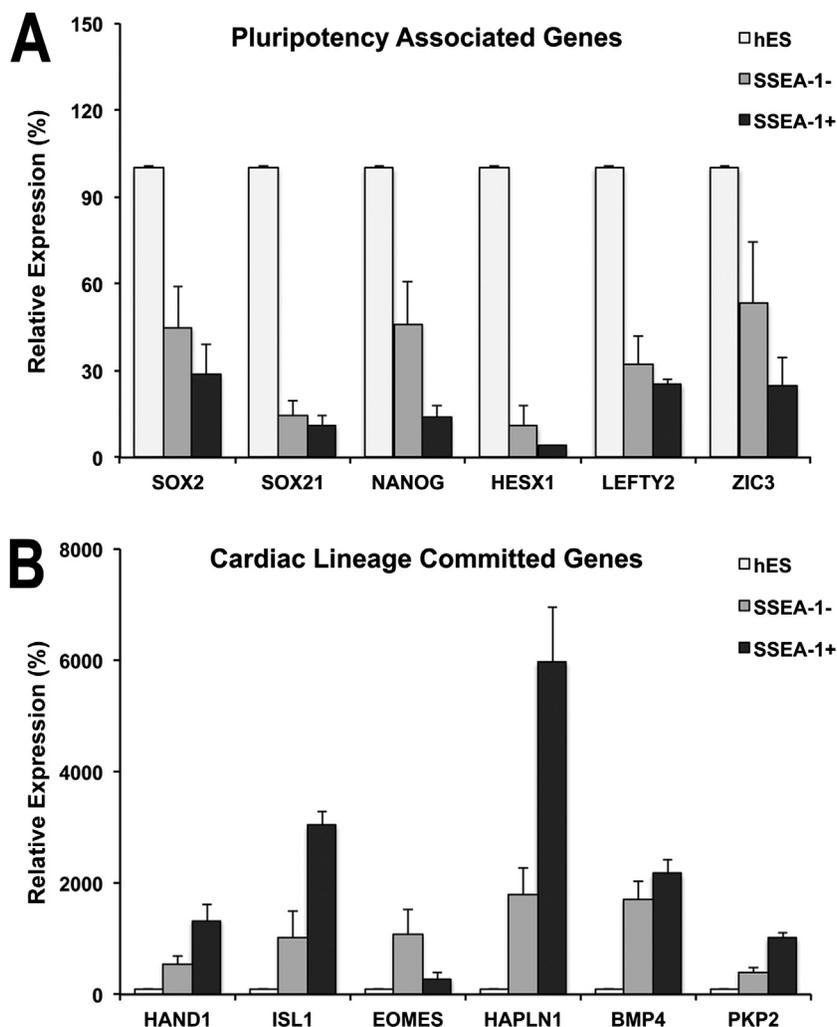


Figure 1 In vitro characterization of human embryonic stem cells (ESC)-derived SSEA-1⁺ progenitors. Expression level of selected pluripotency-associated (A) and cardiac lineage commitment-associated (B) genes, as assessed by a transcriptome analysis using Affymetrix microarrays, in SSEA-1⁺ progenitors, SSEA-1⁻ cells and undifferentiated pluripotent I6 ESC taken as the reference (100%). Data are reported as mean \pm SEM. Heat maps of the transcriptome have been published previously.²⁴

in the sham and control groups (absolute difference between 4 months and baseline: $44.68 \pm 20.83 \mu\text{l}$ [$p = 0.053$] and $50.27 \pm 25.95 \mu\text{l}$ [$p = 0.07$], respectively), whereas the LV dilation was much less pronounced in the treated group (absolute difference between 4 months and baseline: $4.64 \pm 24.07 \mu\text{l}$ [$p = 0.85$]). Patterns of changes in LV end-systolic volumes (LVESVs) still more clearly delineated between-group differences (Figure 3D) as they *increased* in the sham and control groups (absolute difference between 4-month and baseline values: $28.08 \pm 14.65 \mu\text{l}$ and $15.41 \pm 13.36 \mu\text{l}$, respectively), whereas they *decreased* by $16.76 \pm 15.55 \mu\text{l}$ in hearts receiving the cell-loaded fibrin patch ($p = 0.013$ vs sham, $p = 0.052$ vs controls).

The functional efficacy of epicardially delivered SSEA-1⁺ progenitors was partially supported by real-time RT-PCR analysis, which demonstrated a reduced expression of the stress-induced β -myosin heavy chain genes, atrial natriuretic factor, brain natriuretic peptide and periostin in the treated group as compared with sham (data not shown). When these PCR data were combined with LVESV changes to generate a 5-component heart failure index (Figure 4), the

highest score was seen in the sham-operated group (2.24 ± 1.29). It was lower in control hearts (-0.74 ± 0.84) and further decreased in the treated group (-1.75 ± 0.84 , $p = 0.04$ vs sham).

Histologic and immunohistochemical analyses

The extent of fibrosis did not significantly differ between the three groups (Figure 5A). Conversely, angiogenesis in the border zone was significantly greater in the cell+fibrin group ($p = 0.006$ vs sham; Figure 5B). At the 4-month time-point, there was no teratoma in 6 hearts treated with the cell-loaded fibrin patch; these hearts were specifically examined for this complication. Lamin A/C-positive human cells were detected by immunostaining 1 day after transplantation in the patch implantation area (see Figure S1 in Supplementary Material available online), but it could no longer be found after 1 week. Based on this result, we reasoned that the likelihood of cells persisting at 4 months was extremely low, and therefore we used PCR

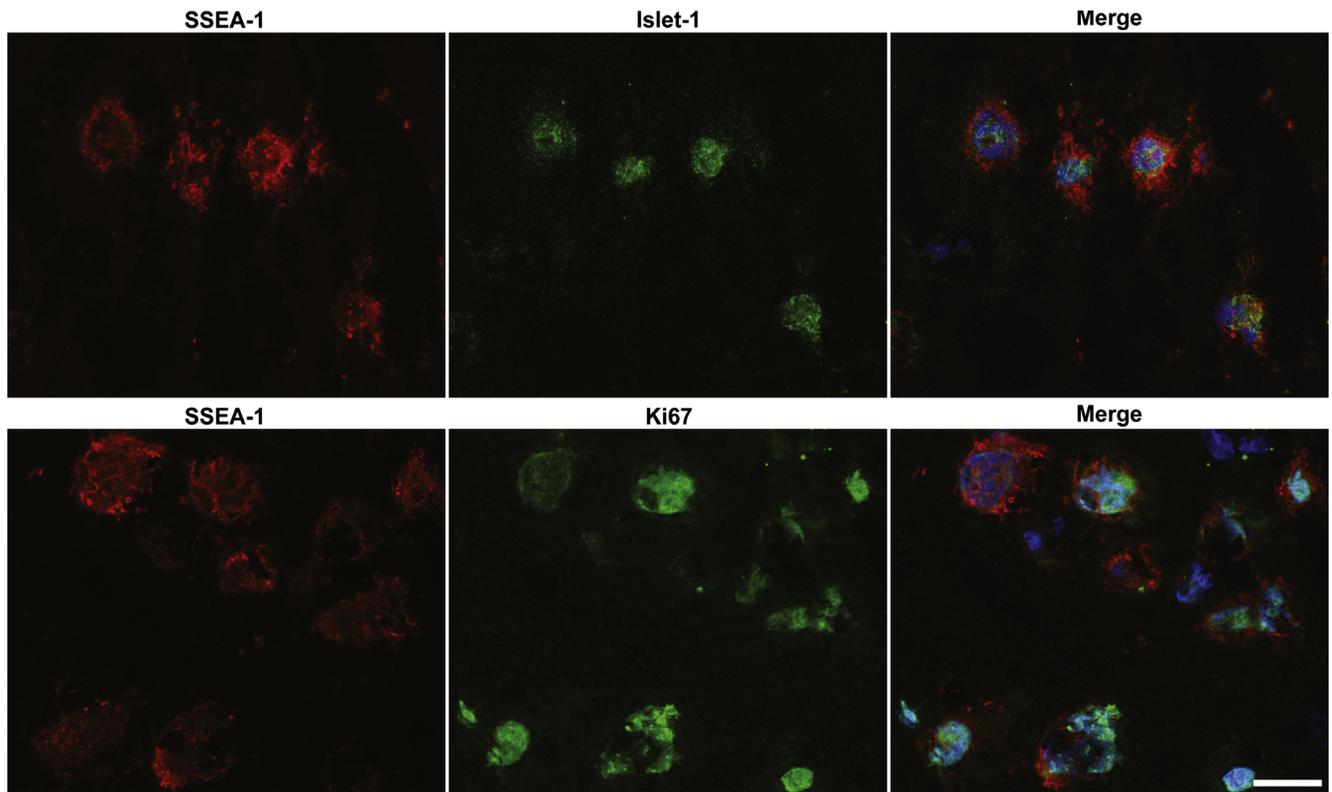


Figure 2 Immunolabeling of SSEA-1⁺ progenitors in the fibrin patch. The upper panel shows that the fibrin-embedded SSEA-1⁺ progenitors express the cardiac transcription factor *Isl-1* (green fluorescence) and the proliferation-associated protein Ki67 (green fluorescence, lower panel). Combined red and green fluorescence and DAPI-stained nuclei (blue) are shown in merged images. Note SSEA-1⁺ progenitors co-stain with either *Isl-1* or Ki67. Bar = 20 μ m.

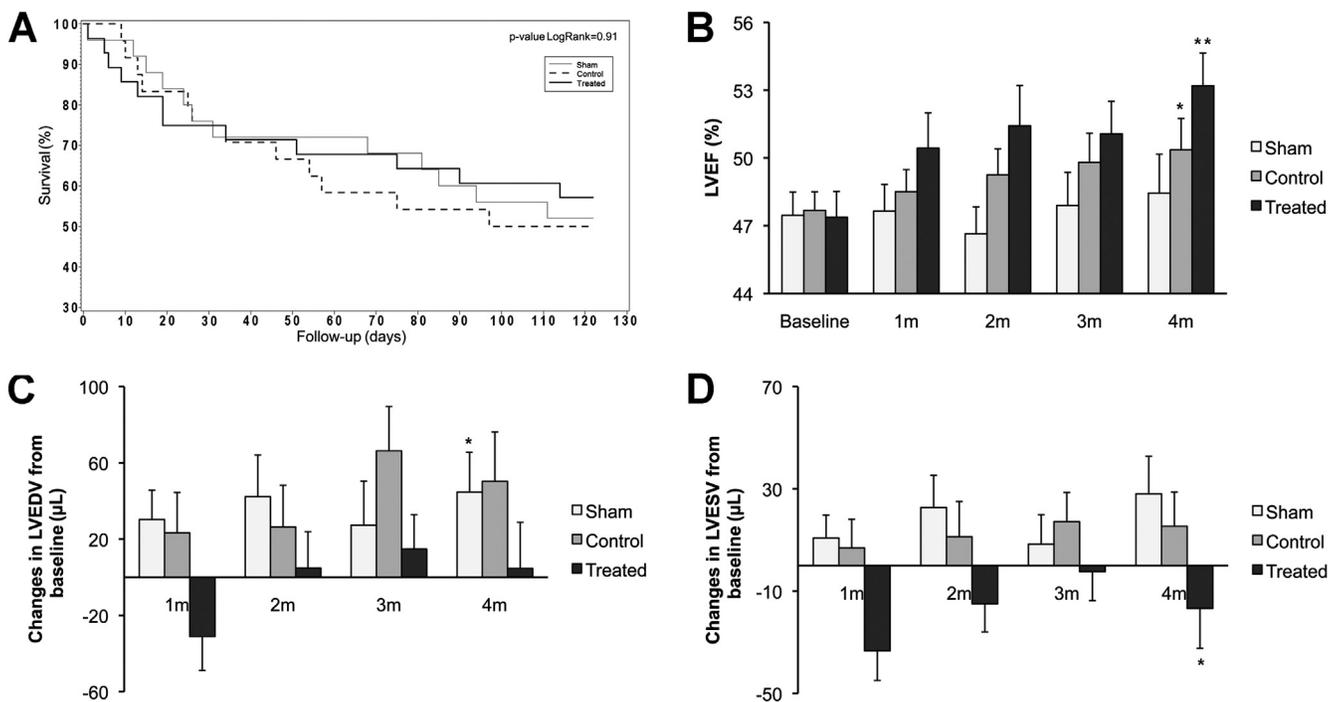


Figure 3 Four-month follow-up of SSEA-1⁺ progenitor-grafted hearts compared with sham and control groups. (A) Kaplan–Meier survival curves during the 4-month follow-up. Percentages are shown for surviving animals in sham ($n = 13$ of 25), control ($n = 12$ of 25) and treated ($n = 16$ of 30) groups. No significant difference was observed in survival rate between the different groups. Significance was analyzed with the log-rank test. (B) Changes in left ventricular ejection fraction (LVEF) over the 4-month follow-up period. Values are presented as percentages (* $p = 0.014$ vs baseline; ** $p = 0.0005$ vs baseline; $p = 0.002$ vs sham). (C) Absolute changes in left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) over the 4-month follow-up period (* $p = 0.053$ vs baseline). (D) Absolute changes in left ventricular end-systolic volume (LVESV) over the 4-month follow-up period (* $p = 0.013$ vs sham; $p = 0.052$ vs controls). Data are reported as mean \pm SEM.

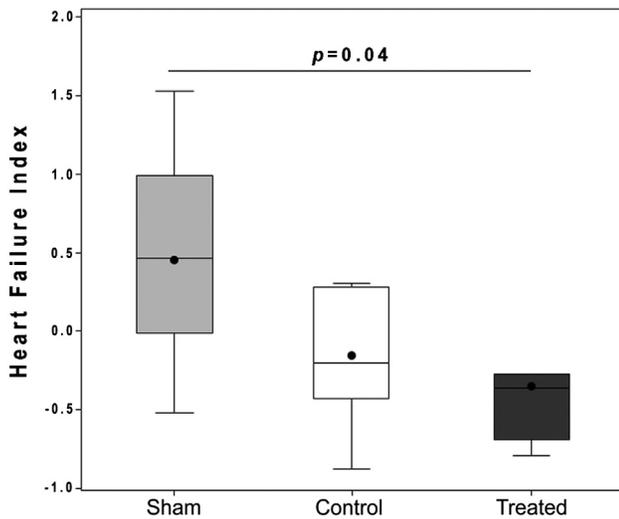


Figure 4 Boxplot representation of the heart failure index. The absolute change in LVESV between 4 months and baseline and the quantitative PCR-based expression of natriuretic peptides A and B, myosin heavy chain 7 and periostin were used to construct a 5-component heart failure index. The score yielded by the control and treated groups was calculated relative to that of the total 20-heart cohort. The boxes represent the lower to upper quartile range, the error bars represent the entire range, the horizontal bar represents the median value, and dot points represent mean values. Note the significantly lower heart failure index in the treated group compared with the sham group.

rather than immunostaining to sensitize their tracking in 6 cells+fibrin-treated hearts, taking 7 sham-operated hearts and 7 acellular fibrin patch-grafted hearts as controls. Three primers were used for probing different regions of the human-specific Alu DNA sequence, but, as expected, there was no detectable signal with either primer at this late time-point in any heart tissue sample (comprising both the area of patch implantation and the non-grafted underlying myocardium).

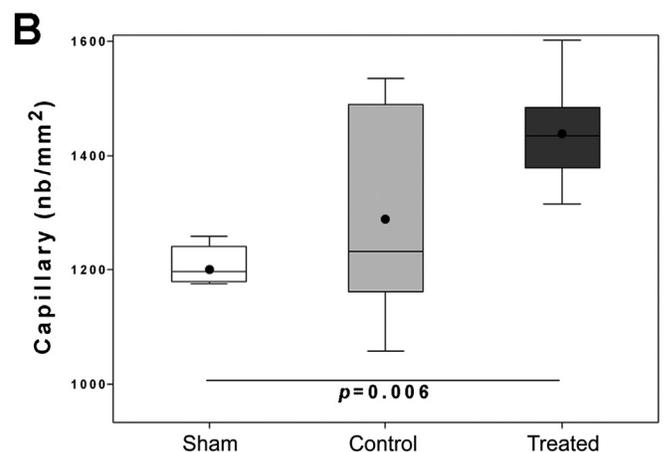
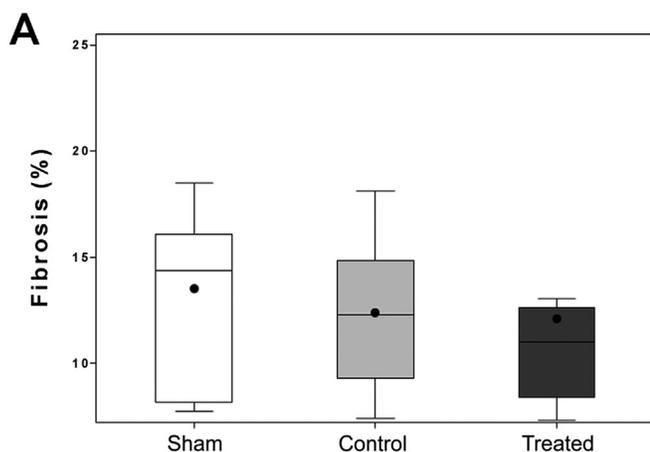


Figure 5 Boxplot representation of fibrosis (A) and number of capillaries (B) in sham, control and treated hearts. Four months after treatment, 6 to 10 sections per heart were stained by Sirius red (fibrosis) or immunostained with a rat-specific endothelial cell antibody (to label capillaries, with 7 sections per heart). The area of fibrosis and number of capillaries were quantified using METAMORPH software (Universal Imaging Corporation, USA). Fibrosis was expressed as the ratio of area of scar tissue to the LV area. The number of capillaries was expressed per square millimeter of the infarct border zone. The boxes represent the lower to upper quartile range, the error bars represent the entire range, the horizontal bar represents the median value, and dot points represent mean values.

Discussion

The major finding of the present study is that a fibrin patch, in which ESC-derived cardiac progenitors have been embedded, improves pump function and limits adverse ventricular remodeling in a rat model of myocardial infarction and that, given the life expectancy of rats, these effects seem to be sustained over a reasonably long period of time.

Cell scaffolding

After having tested several materials, including scaffold-free cell sheets,^{14,15,26} we selected fibrin as the cell matrix. In addition to its multiple aforementioned advantages, fibrin is attractive because of the tunability of its mechanical properties through an adjustment of the fibrinogen-to-thrombin ratio. Thus, in the present experiments, the selected ratio (20 mg/ml and 4 U/ml, respectively) allowed us to achieve both an elasticity modulus (in the range of 6 kPa) matching that reported appropriate for cells of the mesodermal lineage²⁷ and a fiber network density allowing ingrowth of host-derived vessels (Figure 5). The choice of transplanting 700,000 progenitor cells was based on preliminary screening experiments, but we acknowledge that upscaling this number may have increased cell engraftment, at least early after patch delivery, as suggested by our observation of numerous donor cells inside the scaffold in a separate experiment where it was loaded with 2 million cells (Figure 6). This observation matches the finding that fibrin can increase the amount of cells retained into the myocardium 24 hours after an intramyocardial injection.²⁸

Interpretation of outcomes

The present results demonstrate that hearts receiving the cell-free fibrin patch tended to have slightly better functional

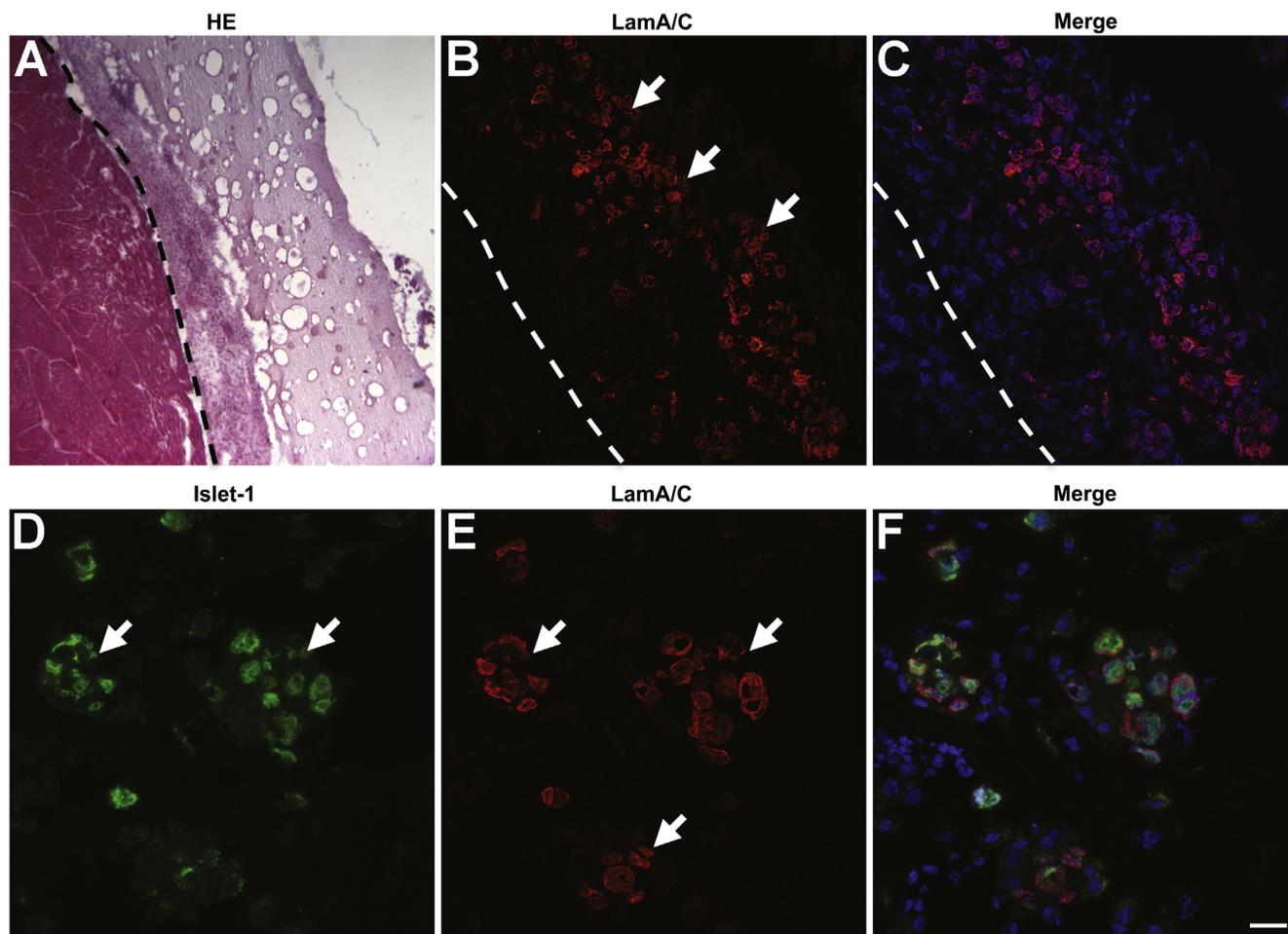


Figure 6 Detection of grafted SSEA-1⁺ progenitors 2 days after delivery of epicardial fibrin patch in a nude rat. In a separate experiment, the fibrin scaffold was intentionally loaded with a large number (2 million) of SSEA-1⁺ progenitors to optimize visualization of cell patterning shortly (48 hours) after epicardial patch delivery. The cells were embedded into the fibrin patch just after magnetic sorting and grafted in an μ/μ nude rat 3 weeks after left coronary ligation. (A) Hematoxylin–eosin (HE) staining shows incorporation of the fibrin patch harboring the SSEA-1⁺ progenitors to the surface of the heart. Grafted cells were identified by human specific lamin A/C antibody [(B, E) red fluorescence]. Many lamin A/C-positive cells still expressed the cardiac transcription factor *Islet-1* [(D) green fluorescence]. (C, F) Merged images show (C) lamin A/C+DAPI-stained blue nuclei and (F) combined green (*Isl-1*)+red (lamin A/C) fluorescence. Arrows indicate grafted cells. Dotted lines indicate the border between the fibrin patch and the heart. Bar = 150 μ m (A), 40 μ m (B, C) or 20 μ m (D-F).

outcomes than the sham-operated animals, which has been reported previously with the use of injected fibrin alone²⁹ and which likely reflects an angiogenic effect.^{30,31} However, embedding SSEA-1⁺ cells in the fibrin matrix further improved contractile function and stabilization of remodeling as cells+fibrin-treated hearts consistently yielded higher LVEF values (the increase of which between 4 months and baseline was more than 2-fold higher than in the acellular fibrin group), but more importantly lower LVEDV and LVESV values compared with their cell-free counterparts. Although focus on EF could suggest that LV function was only moderately impaired at baseline (after infarction), analysis of LV volumes at the same time-point shows that they were dramatically enlarged compared with healthy hearts,^{32,33} which makes the 4-month attenuation of remodeling yielded by the cells+fibrin patch functionally relevant, particularly if one keeps in mind that LVESV has been reported to be a strong predictive factor of outcome in patients after a myocardial infarction.³⁴ In keeping with

these data, the cell-scaffold product also achieved the lowest value of the heart failure index generated by combining genomic and functional end-points associated with heart failure,³⁵ cardiomyopathy³⁶ and adverse LV remodeling.³⁷

Overall, our findings are consistent with those previously reported with the use of fibrin in an injectable form mixed with skeletal myoblasts³⁸ or bone marrow-derived cells,^{28,39} or as an epicardial patch loaded with mouse ESC-derived BMP-2-treated cardiac progenitors⁴⁰ or human ESC-derived vascular cells⁴¹ in rat and porcine myocardial infarct models, respectively. Compared with the latter two studies, the present one differs by: (1) the phenotype of the cells (in the Vallée et al study,⁴⁰ ESC-derived cardiac progenitors were of mouse origin, whereas, in the Xiong et al study,⁴¹ the derivatives of the human ESC were not cardiomyocytes); (2) the extension of follow-up to 4 months (vs 50 days and 4 weeks in the studies by Vallée et al and Xiong et al, respectively); and (3) the fact that the tested cell-scaffold construct was manufactured, processed and

quality-controlled under similar conditions as those used for the product planned for human use. It is even possible that the beneficial effects of the fibrin material could have been optimized by seeding cells at the surface of the fibrin biomatrix instead of incorporating them into the biomatrix.⁴²

The mechanism of the incremental benefit afforded by the cell-loaded fibrin patch remains to be investigated. A de novo muscularization of the infarct tissue by the grafted cells can be excluded. In the present study, two methods were used for tracking donor cell fate: lamin A/C protein expression and human Alu gene expression. As early as 1 week after patch implantation, lamin A/C-positive cells could no longer be detected and, as expected, were not identified either after 4 months, despite the use of a highly sensitive PCR-based tracking method.⁴³ With the caveat of a shorter follow-up, a higher survival rate has been reported with the use of a fibrin patch loaded with human ESC-derived vascular cells,⁴¹ which may be related to differences in cell phenotype, processing or timing of delivery. Thus, the contrast, in the present experiments, between the absence of a long-term cell engraftment and a sustained functional benefit, similar to what has been reported with other cell types,⁴⁴ strongly supports a cell-induced paracrine signaling initiating a cascade of self-sustained events. This would be consistent with an attenuation of fibrosis and the increase in angiogenesis seen in the treated group.

Our failure to identify cells expressing both markers of proliferation (Ki67) and cardiac lineage (troponin I) does not necessarily rule out an additional increase in the contractile cell pool (by mobilization of endogenous stem/progenitors or new divisions of mature cardiomyocytes), which could have been missed because of the late post-procedural sampling time (4 months). This paracrine hypothesis is relevant to the patch-based delivery strategy, as shown by the ability of a cardiomyocyte-containing alginate scaffold to improve post-infarction heart function, even though the grafted cells remain insulated from the host myocardium and therefore cannot couple with them.⁴⁵

Reliance on paracrine effects has practical implications in that it leads to focus on the enhancement of early retention of grafted cells (rather than on their sustained survival), within a time-frame matching the release of cell-derived biomolecules, which could then paracrinally foster innate repair pathways before clearance of the donor cells.⁴⁴ We acknowledge that we did not dissect out the molecular events underpinning the postulated paracrine activation of endogenous reparative responses. Indeed, an increasing role is attributed to exosomes as possible mediators of the cells' paracrine effects^{46,47} and deciphering the nature of their content, particularly the microRNA profile, should help in mechanistically identifying the various pathways targeted by the cell-released biomolecules while providing clues for developing cell mimetics more suitable for large-scale clinical applications.

An major finding was the lack of teratoma in the immunodeficient rats after 4 months. This likely reflects the efficiency of the selection procedure aimed at discarding the cells unresponsive to the cardioinstructive cues. In this

study, the population of progenitors was purified by immunomagnetic sorting against SSEA-1 (also called Sialyl-Lewis^X), a carbohydrate moiety expressed early during the differentiation of pluripotent ESC,⁴⁸ which is consistent with the fact that cell-surface proteins incur changes in their glycosylation patterns when they transition from pluripotency to differentiation. The transcriptomic analysis of the purified SSEA-1⁺ population has confirmed the down-regulation of pluripotency genes (primarily *NANOG* and *SOX-2*), which may still be expressed at various degrees in the residual contaminating SSEA-1⁻ cells, but probably not to the extent that a teratoma can develop because injection of this sole fraction in immunodeficient mice still failed to induce teratoma formation.²⁴ The disappearance of the cells over time may also be considered an additional fail-safe mechanism.

Limitations

We acknowledge several limitations of this study. First, the follow-up was not extended beyond 4 months. However, such a duration is significant given the rat's life expectancy, and the stability of functional data, as evidenced by the serial echocardiograms, provides an encouraging signal regarding the maintenance of functional benefits over time. A second limitation is that cells may not migrate into the myocardium. This would be an issue if the grafted cells were supposed to generate a de novo myocardial tissue but, indeed, is not if they act primarily by releasing a blend of factors that can be released from the patch toward the underlying myocardium to harness endogenous repair pathways. Third, we did not document the potential occurrence of arrhythmic events. However: (i) the survival rate of the treated rats was not different from that of sham-operated animals; although we were not able to determine causes of death in each group, this indirectly argues against a substantially greater occurrence of cell-induced life-threatening arrhythmias, and (ii) patches have been reported to be less arrhythmogenic than injections.⁹ Fourth, our "customized" heart failure score should be interpreted with caution because it has not been externally validated and was constructed as a post hoc composite of variables. Nevertheless, this index was not designed to predict survival like the heart failure scores commonly used in the clinics,⁴⁹ but rather to assess whether the combination of end-points generated by different methods (echocardiography and genomics)—yet all relevant to heart dysfunction—would confirm the benefits of the cells+scaffold approach, which actually turned out to be the case. Finally, no mechanistic study was done to determine specifically the causes of cell loss that may have been facilitated by two model-intrinsic features: (1) an immune response related to the xenogeneic setting of the transplantation and which cannot be excluded, even in the nude rat; and (2) the stress that human cells must withstand when they are implanted in a rapidly beating rodent heart.

In conclusion, the present data support the functional efficacy of fibrin scaffolds harboring ESC-derived cardiac

progenitors and provide additional evidence that long-term cell engraftment may not be a prerequisite for a sustained benefit. As such, our findings may serve as a platform for further development of cell-based, cell-mimetics-based or biomaterial-based strategies aimed at fostering endogenous reparative responses.

Disclosure statement

The authors have no 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, the LeDucq Foundation (SHAPEHEART network), the Fondation Coeur et Artères, the Fondation de l'Avenir (ET2-658) and the Association Française contre les Myopathies (ANR-12-RPIB-0015). P.J. was supported by a fellowship from the Fondation Lefoulon-Delalande and S.B. from the Conseil Régional d'Ile de France (DIM Biothérapies). The final two authors listed on the title page (O.M. and P.A.) contributed equally to this work.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at www.jhltonline.org.

References

- Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013;12:689-98.
- Crisostomo PR, Abarbanell AM, Wang M, et al. Embryonic stem cells attenuate myocardial dysfunction and inflammation after surgical global ischemia via paracrine actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1726-35.
- Li TS, 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.
- Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, et al. 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* 2013;61:2329-38.
- Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, et al. 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* 2014;63:110-22.
- Pal R. Embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes: a good candidate for cell therapy applications. *Cell Biol Int* 2009;33:325-36.
- Aguado BA, Mulyasmita W, Su J, et al. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng Part A* 2012;18:806-15.
- Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation* 2007;115:2254-61.
- Terajima Y, Shimizu T, Tsuruyama S, et al. Autologous skeletal myoblast sheet therapy for porcine myocardial infarction without increasing risk of arrhythmia. *Cell Med* 2014;6:99-109.
- Sekine H, Shimizu T, Dobashi I, et al. Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2973-80.
- Le Visage C, Gournay O, Benguirat N, et al. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue Eng Part A* 2012;18:35-44.
- Sekiya N, Tobita K, Beckman S, et al. Muscle-derived stem cell sheets support pump function and prevent cardiac arrhythmias in a model of chronic myocardial infarction. *Mol Ther* 2013;21:662-9.
- Araña M, Gavira JJ, Peña E, et al. Epicardial delivery of collagen patches with adipose-derived stem cells in rat and minipig models of chronic myocardial infarction. *Biomaterials* 2014;35:143-51.
- Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, et al. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg* 2009;87:1196-203.
- Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, et al. Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections. *Cardiovasc Res* 2011;91:483-91.
- Gaballa MA, Sunkomat JN, Thai H, et al. Grafting an acellular 3-dimensional collagen scaffold onto a non-transmural infarcted myocardium induces neo-angiogenesis and reduces cardiac remodeling. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:946-54.
- Barsotti MC, Felice F, Balbarini A, Di Stefano R. Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;58:301-10.
- Rajangam T, An SS. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. *Int J Nanomed* 2013;8:3641-62.
- Rousou JA. Use of fibrin sealants in cardiovascular surgery: a systematic review. *J Card Surg* 2013;28:238-47.
- Leschik J, Stefanovic S, Brinon B, et al. Cardiac commitment of primate embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2008;3:1381-7.
- Verma V, Purnamawati K, Manasi, et al. Steering signal transduction pathway towards cardiac lineage from human pluripotent stem cells: a review. *Cell Signal* 2013;25:1096-107.
- Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2005;118:4495-509.
- Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic is11+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006;127:1151-65.
- Menasché P, Vanneaux V, Fabreguettes J, et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J*. [e-pub ahead of print], <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehu192>. Accessed May 16, 2014.
- Blin G, Nury D, Stefanovic S, et al. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in post-myocardial infarcted non-human primates. *J Clin Invest* 2010;120:1125-39.
- Hamdi H, Boitard S, Planat-Benard V, et al. Efficacy of epicardially-delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2013;99:640-7.
- Jacot JG, McCulloch AD, Omens JH. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophys J* 2008;95:3479-87.
- Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One* 2009;4:e6005.
- Christman KL, Fok HH, Sievers RE, et al. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng* 2004;10:403-9.
- Liu J, Hu Q, Wang Z, et al. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H501-11.
- Ye L, Zhang P, Duval S, et al. Thymosin β 4 increases the potency of transplanted mesenchymal stem cells for myocardial repair. *Circulation* 2013;128(suppl):S32-41.
- Kang KT, Coggins M, Xiao C, et al. Human vasculogenic cells form functional blood vessels and mitigate adverse remodeling after ischemia reperfusion injury in rats. *Angiogenesis* 2013;16:773-84.
- Sabatini CF, O'Sullivan ML, Valcour JE, et al. Effects of injectable anesthetic combinations on left ventricular function and cardiac morphology in Sprague-Dawley rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013;52:34-43.

34. Norris RM, White HD, Cross DB, et al. Prognosis after recovery from myocardial infarction: the relative importance of cardiac dilatation and coronary stenoses. *Eur Heart J* 1992;13:1611-8.
35. Tan FL, Moravec C, Li J, et al. The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:11387-92.
36. Gibbons GH, Liew CC, Goodarzi MO, et al. Genetic markers progress and potential for cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:(IV-47-58).
37. Stansfield WE, Andersen NM, Tang RH, et al. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1916-21.
38. Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, et al. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculation formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:654-60.
39. Ryu JH, Kim IK, Cho SW, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials* 2005;26:319-26.
40. Vallée JP, Hauwel M, Lepetit-Coiffé M, et al. Embryonic stem cell-based cardiopatches improve cardiac function in infarcted rats. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:248-60.
41. Xiong Q, Hill KL, Li Q, et al. A fibrin patch-based enhanced delivery of human embryonic stem cell-derived vascular cell transplantation in a porcine model of postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 2011;29:367-75.
42. Gerard C, Forest MA, Beauregard G, et al. Fibrin gel improves the survival of transplanted myoblasts. *Cell Transplant* 2012;21:127-37.
43. Schneider T, Osl F, Friess T, et al. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR—an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:571-82.
44. Levit RD, Landázuri N, Phelps EA, et al. Cellular encapsulation enhances cardiac repair. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000367.
45. Wendel JS, Ye L, Zhang P, et al. Functional consequences of a tissue-engineered myocardial patch for cardiac repair in a rat infarct model. *Tissue Eng Part A* 2014;20:1325-35.
46. Chen L, Wang Y, Pan Y, et al. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;431:566-71.
47. Ibrahim AGE, Cheng K, Marban E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep* 2014;2:606-19.
48. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, et al. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res* 2012;111:344-58.
49. Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, et al. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation* 2006;113:1424-33.

Annexe 3



Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers



Maria Kitsara^{a,*}, Pierre Joanne^{b,1}, Solène Emmanuelle Boitard^b, Ibtihel Ben Dhiab^a, Barbara Poinard^b, Philippe Menasché^{c,d}, Christian Gagnieu^e, Patricia Forest^e, Onnik Agbulut^b, Yong Chen^{a,f}

^a Ecole Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, Sorbonne Universités – UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 8640 PASTEUR, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France

^b Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, Paris 75005, France

^c Dept of Cardiovascular Surgery & INSERM U 970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris 75015, France

^d University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

^e Biom'Up, 8, allée Irène Joliot Curie, 69 800 Saint Priest, France

^f Institute for Integrated Cell-Material Science, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2014

Received in revised form 9 February 2015

Accepted 17 February 2015

Available online 26 February 2015

Keywords:

Electrospinning
Collagen scaffold
Biocompatibility
Tissue engineering
Cardiac cell therapy

ABSTRACT

Synergy between micro-nanotechnology and regenerative medicine can lead to new tools for health improvement. In this study, we investigate the efficacy of electrospun scaffolds – fabricated using clinically approved collagen – as supports for cardiomyoblast culture. The scaffolds were prepared using non-toxic solvents and crosslinking agents and characterized by scanning electron microscopy and contact angle measurements. Among different types of collagen samples, we found that atelocollagen can produce better quality of electrospun fibers than acid and basic fibrous collagen. Our results also show that the cell culture performance can be improved by adjusting the crosslinking conditions. Typically, increasing the concentration of citric acid of the cross-link agents from 5% to 10% w/w and the post-crosslink baking time from 1.5 to 2.5 h led to significant increases of the cellular colonization of the scaffold, showing three-dimensional growth of cardiac cells due to the specific morphology of the fibrous scaffolds. Finally, in vivo tests of the biocompatibility of the fabricated scaffolds have been done using a mouse model of dilated cardiomyopathy. As expected, the biocompatibility of the scaffold was found excellent and no visible inflammation was observed after the implantation up to two weeks. However, 5% citric acid electrospun collagen scaffolds was less resistant in vivo, proving again the importance of the processing parameter optimization of the electrospun scaffolds.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Engineered scaffolds have been widely used as structural and functional supports on which cells are seeded for the generation of cell therapy products. In the field of cardiac therapy, this approach is challenging but holds a real promise for improving function of the chronically failing myocardium [1]. Previously, a large number of investigations have been devoted to the culture of cardiac cells using scaffolds made of synthetic polymers. In particular, nanofibrous scaffolds obtained by electrospinning of poly-L-lactic acid (PLLA) and poly-(caprolactone) (PCL) could be produced for the formation of functional cardiac cell layers [2].

However, because of the lack of cell affinity these synthetic polymers are inherent less attractive than natural polymers – such as collagen, fibrinogen, elastin – for in vivo applications [3]. Among them, collagen constitutes one of the main proteins of the extracellular matrix, and this allows for a close simulation of the natural fibrillar structure of cardiac tissue [4]. Accordingly, it is interesting to consider electrospun collagen scaffolds as supports and carriers of cardiac cells that can be implanted for repair of the failing myocardium [5].

Different types of clinically approved collagen are now available but the ability of making fibrous scaffolds out of them has yet to be demonstrated. One of the issues is the crosslinking process, which uses chemical reagents to render the fibrous structures stable in the culture medium and after implantation. The most common crosslinkers for collagen fibers are glutaraldehyde – well known for its efficiency but somehow toxic – and combinations of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) – a system which is less

* Corresponding author at: Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Campus Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 594 77 00x2451; fax: +34 93 580 02 67.

E-mail addresses: maria.kitsara@imb-cnm.csic.es, kitsara.m@gmail.com (M. Kitsara).

¹ These authors contributed equally to this work.

toxic but often causes a film-like morphology after the immersion of the fibers in water [6] [7]. Alternatively, a citric acid (CA) based system has been recently applied and shown the requested biocompatibility [8].

In this work, we study the electrospinning parameters of clinically approved collagen in order to produce optimal nanofiber scaffolds for three-dimensional culture of cardiac cells. In particular, we were interested in creating a patch form of scaffold that can be used for therapy purposes. Our results show that the colonization of cardiac cells is critically dependent on the crosslink parameters and that our collagen scaffolds are fully compatible with the implantation requirements, thereby providing a way towards a scaffold based cardiac cell therapy.

2. Materials and methods

2.1. Collagen solutions preparation and electrospinning

Different types of clinically approved collagen, including atelocollagen, acid fibrous, basic fibrous were provided by Biom'Up (Saint-Priest, France) in form of dry material after lyophilization. For electrospinning, the raw collagen materials were dissolved using a solvent system containing ethanol, water and a variety of salts [7]. Specifically, the buffer solution is composed of the following salts dissolved in deionized water: potassium chloride, sodium chloride, potassium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic heptahydrate. The salts concentration is 20× in the collagen buffer solution. The final solvent system consists of buffer solution and ethanol in a ratio 1:1 v/v with a collagen concentration of 16% w/v.

For the crosslinking of the collagen scaffolds a system containing CA, glycerol as extending agent and sodium hypophosphite (SHP) as catalyst was used [8]. The three crosslinking components were added to the collagen solution before the electrospinning. Different concentrations of CA and SHP were studied: 5% CA with 2.1% SHP and 10% CA with 4.2% SHP, keeping constant the glycerol amount to 3% (weight percentage based on the weight of collagen).

In electrospinning, the solution is fed through a thin needle opposite to a collecting plate and a high voltage is applied to form a jet of the solution that travels from the needle to the grounded

collecting plate (Fig. 1). In our study, the collagen solution was loaded to a syringe with a 23 gauge blunt needle and the flow rate was controlled via a pump at 1 ml/h. By applying voltage of 13.5 kV and keeping a distance of 5 cm between the needle tip and the grounded collector, fibers were deposited to the latter at room temperature (20 ± 2 °C). After 8 min of continuous electrospinning, collagen scaffolds were obtained that could be easily peeled off from the collector (Fig. 2).

2.2. Post-electrospinning treatment

After electrospinning, a crosslinking post-treatment was applied in order to make the scaffolds insoluble in cell culture medium and facilitate their handling. The carboxyl groups of CA reacted with the additional hydroxyl groups introduced by glycerol in order to form covalent bridges between the collagen fibers. The scaffolds were baked at 150 °C for three different periods (1.5 h, 2 h, 2.5 h).

The crosslinked scaffolds were mounted onto handling devices for biologic assays. Cell crowns® holders were utilised for this purpose and then placed in 24-well plates for cell culture.

2.3. Characterization methods

The structure of the electrospun collagen scaffolds was studied after the steps of electrospinning and crosslinking treatment using scanning electron microscopy (SEM) and contact angle measurements.

The SEM measurements were performed using the e-LiNE (Raith). A thin gold layer of 5 nm was deposited prior to measurements and images at different magnifications were obtained on at least three different areas in the same sample. The measurements were performed under extra high tension of 10 kV.

The contact angle measuring instrument was the Drop Shape Analyzer – DSA 30 (Krüss). The sessile drop method was utilized and the measurements took place at room temperature (20 °C). The volume of the applied droplets of deionized water was 1.5 µl. The contact angle data were obtained by averaging over five measurements in different areas on the sample surface.

2.4. Cardiomyoblasts culture

The H9c2 cell line derived from embryonic rat heart tissue was used in this study. Cells were cultured in high glucose DMEM + Glutamax supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. They were seeded on the collagen scaffold after passage using trypsin-EDTA. After two days of culture, scaffolds were washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde solution. After 2 washing steps, they were incubated with 5% bovine serum albumin (BSA) during 1 hour. Then Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Life technologies) was used to stain

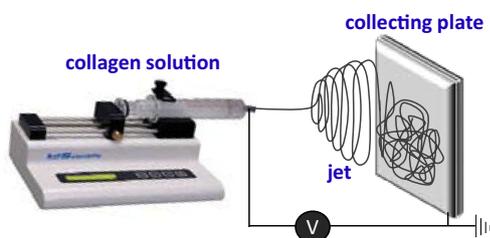


Fig. 1. Schematic representation of the electrospinning apparatus.

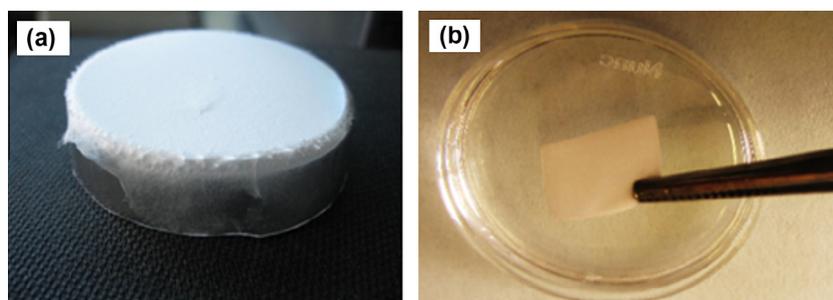


Fig. 2. Images of the atelocollagen fibrous scaffold (a) deposited onto aluminum collector, (b) after the peeling-off.

the cells. After 3 washes in PBS, collagen scaffolds were mounted with mowiol. Images were captured using a motorized confocal laser scanning microscope (LSM 700, Zeiss).

2.5. Epicardial grafts

All procedures were approved by our institutional Ethics Committee and complied with the European legislation (Directive 2010/63/EU) on animal care. Conditionally-invalidated serum response factor (SRF) mice (MHC-MerCreMer:Sf/Sf) were used as recipients [9]. The Cre-mediated excision of floxed SRF alleles in the heart was induced by daily intraperitoneal tamoxifen (28 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{day}$; Sigma-Aldrich, France) injections on 3 consecutive days with the day of the first injection counted as day 1. Three weeks after tamoxifen administration, the animals underwent a left lateral thoracotomy after intraperitoneal ketamine (100 mg/kg; Merial, France)-xylazine (10 mg/kg; Bayer, Germany) anaesthesia and tracheal ventilation. Analgesia was performed for 2 days after surgery with a 10 mg/kg subcutaneous injection of ketoprofen (Merial). Acellular collagen scaffolds were sutured on the left ventricle. All animals were sacrificed at the end of experiment by cervical dislocation. Hearts were immediately removed, fixed in Tissue-Tek (Sakura, USA) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane until they were sliced into 8–12- μm thick cryosections using a cryostat. The sections were stained with HE (hematoxylin and eosin) as described by Dubowitz [10]. Images were taken with an inverted microscope (Leica DMIL) equipped with a digital camera (Qicam, Qimaging).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of crosslinked scaffolds

3.1.1. SEM

Amongst the different collagen types, atelocollagen derived from native collagen by enzymatic extraction exhibited the best performance both in terms of dissolution to the benign solvent system (within few hours at room temperature) and of electrospinning ability. The acid fibrous collagen required one week to be

dissolved and the basic fibrous collagen was not compatible with the used solvent system resulting to a partial dissolution after 3 weeks. All the types of collagen were tested for their ability to create fiber mats by electrospinning. Acid and basic fibrous types ended up to nanofibers with knots and it was not able to create a thick enough mat that could be unpeeled from the collector. These types of nanofibers might be used for the surface modification of cell culture substrates e.g., by directly depositing the electrospun fibers on the latter, but cannot be used as implantable scaffolds which is our intention. On the other hand, atelocollagen proved to be able to create uniform continuous fibers without knots (Fig. 3) that can be easily unpeeled from the collector (Fig. 2). Fig. 3a and b show the atelocollagen mesh-structured scaffold and demonstrate, at a higher magnification, the uniformity of the fibers with a diameter of $1 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

After the post-electrospinning crosslinking treatment, the samples were characterized before and after their immersion into deionized water in order to verify the efficacy of the method. Neither the duration of baking nor the concentration of the cross-linkers did affect the fibers morphology before the immersion to water.

Conversely, the morphology of the samples after the immersion in water varied in relation with the concentrations of CA and SHP. At low concentrations, loss of porosity was observed as shown in Fig. 4a, whereas the morphology was significantly improved for 10% CA and 4.2% SHP (Fig. 4b and c).

3.1.2. Contact angle measurements

Collagen scaffolds before and after the crosslinking treatment were then characterized. Fig. 5a shows the surface of a non-crosslinked scaffold, five seconds after the deposition of water droplet, which spread immediately all over the scaffold, causing scaffold dissolution. For the measurements of the crosslinked scaffolds with 10% CA, the latter were immersed in water and then placed in cell crowns® holders. The water contact angles obtained with dry samples showed that the surfaces did not dissolve, but are hydrophilic with a contact angle of 50° just five seconds after the droplet deposition (Fig. 5b). The water contact angles decreased down to 30° just 60 seconds after the droplet deposition, which further indicates the porosity of the samples (Fig. 5c).

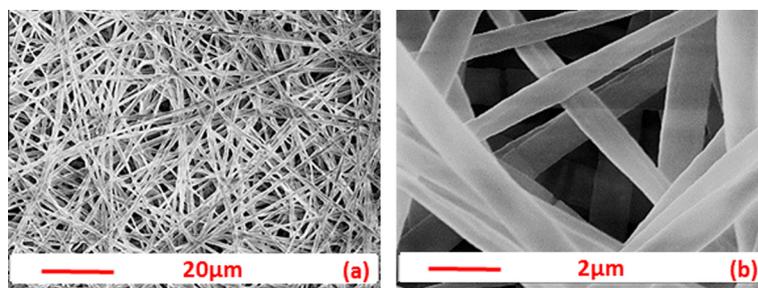


Fig. 3. SEM images of atelocollagen fibers after electrospinning at different magnifications: (a) $1\times$ and (b) $10\times$.

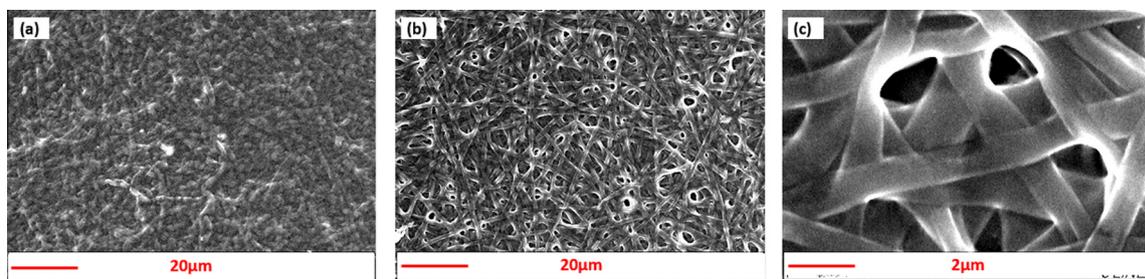


Fig. 4. SEM images of crosslinked collagen scaffolds after immersion in water (a) 5% CA, (b) 10% CA and (c) 10% CA at higher magnification.

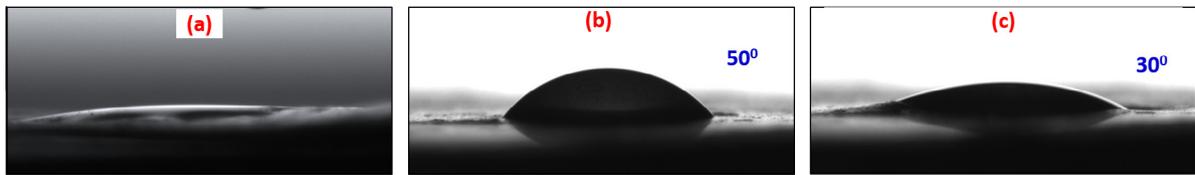


Fig. 5. Images of water droplets on collagen scaffolds with 10% CA (a) uncrosslinked, (b and c) crosslinked captured at different time after droplet deposition.

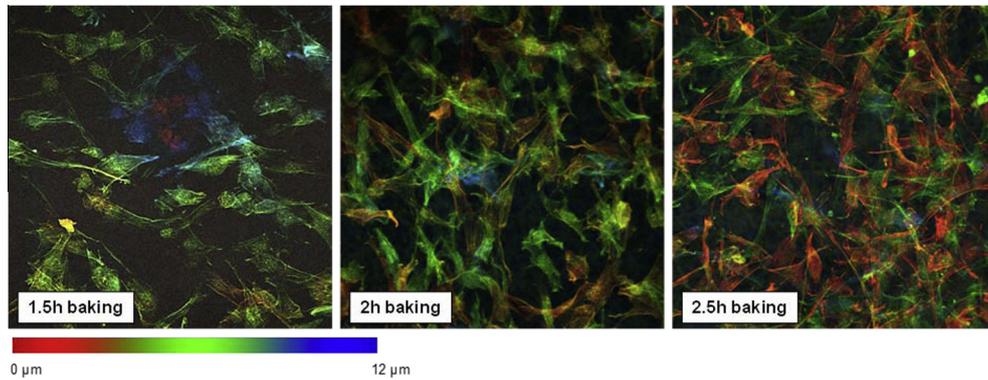


Fig. 6. Confocal images of H9c2 cardiomyoblasts on the electrospun collagen scaffold (10% CA) after 48 h cell culture.

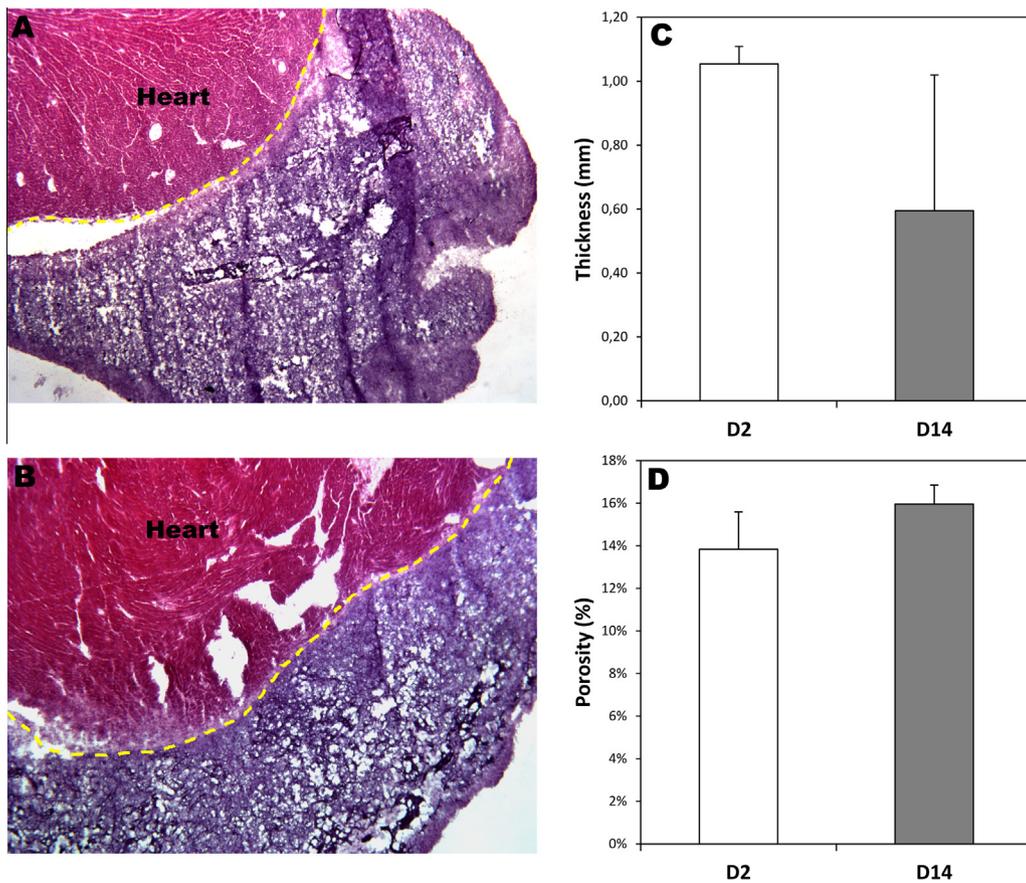


Fig. 7. Biocompatibility of the electrospun collagen scaffold. Hearts of aMHC-MerCreMer:Sf/Sf mice were explanted 2 days (A) or 14 days (B) after implantation. The mean thickness (C) and the porosity (D) of the grafted patches were analyzed.

3.2. Biological validation of the scaffolds

3.2.1. *In Vitro Studies: cellularization of collagen scaffolds*

The electrospun collagen scaffolds were successfully used for culture of H9c2 cells. Fig. 6 shows a confocal microscopic image after immunostaining for actin and nuclei which demonstrates the colonization of the 10% CA scaffold. Clearly, the cells were spread all over the scaffold and show a nice structure of their actin filaments (the blue cells are more deeply sunk into the collagen than the others). The cells seem to spread more extensively as the baking time was longer. It should be noted that, by increasing the baking time, the stiffness should be enhanced, which could be more desirable in our case. Moreover, comparing the different concentrations of CA, it is obvious that the higher baking time (2.5 h) led to a greater extent of cell colonization.

Preliminary experiments with human pluripotent stem cell-derived cardiac progenitors have also been performed, showing a promising efficacy of the fabricated collagen scaffold. The next step will be the implantation of the cell-seeded scaffold in mice with failing myocardium with the hope that the scaffold may provide an optimal microenvironment to the cells, thereby allowing them to improve heart function, either by integrating structurally within the recipient tissue or, more likely, by activating endogenous reparative pathways.

3.2.2. *In Vivo Studies: implantation of acellular collagen scaffolds*

In this study, we used a double transgenic mouse model which allows the inactivation of SRF only in cardiomyocytes as tamoxifen-inducible Cre recombinase expression is under the control of the cardiomyocyte-specific alpha myosin heavy chain promoter [9]. Five days after tamoxifen injection there is a drop of SRF mRNA and protein levels. Then, mice exhibit a progressive dilated cardiomyopathy, leading to a non-ischaemic heart failure and death within 10 weeks. This model allows a timed control of the functional deterioration, thereby allowing a better comparison between treated and non-treated mutant animals.

Non-ischaemic heart failure can only be treated by drugs in contrast to ischaemic cardiomyopathies. If the treatment fails, the only remaining options are heart transplantation or permanent implantation of assist devices [11]. Our goal is to develop cell therapy as a new tool for the cure of non-ischaemic cardiomyopathies. The first issue to address is the biocompatibility of the nano-fabricated collagen scaffold. To this end, 10 conditionally-invalidated serum response factor (SRF) mice (aMHC-MerCreMer:Sf/Sf) were transplanted with the 10% CA collagen scaffold. The biocompatibility was found excellent, as the scaffold was detectable from 2 days (4 mice) to 2 weeks (6 mice) after the implantation, with no visible inflammation (Fig. 7A and B). It was slightly degraded over time as its thickness only decreased to 60% after 2 weeks of implantation (Fig. 7C). This decreased thickness also indicates that the inflammation is very low. Moreover, the porosity of the electrospun collagen scaffold did not significantly change between 2 and 14 days, indicating that the structure of the patch is not altered (Fig. 7D). It should be noted, that we also implanted 5% CA electrospun collagen scaffolds in 12 mice. The results were very similar to the 10% CA after 2 days of implantation. But after 2 weeks, we were not able to find the scaffolds in 62.5% of the implanted mice. This suggests that the 5% CA electrospun collagen scaffolds seem to be less resistant in vivo. Together, all these results demonstrate the good biocompatibility of the electrospun clinically-approved collagen scaffold in the context of dilated cardiomyopathy.

4. Conclusions

The present work has been designed to create a cardiac patch which can be used as a cell carrier for therapy purposes. Among different approaches, electrospinning appears to be the simplest but yet versatile method for the fabrication of fibrous scaffolds from a large variety of materials. Then, the challenge is to find the most suited material and processing parameters. Although the electrospinning techniques have been well documented, few of them applied to cardiac cell therapy which requires a full control of the porous size, the mechanical stiffness and the bio-reactivity or biodegradability of the scaffold. As a first step of our approach, we produced nanofibers by electrospinning of a clinically proven collagen dissolved in a non-toxic solvent system in contrary to the widely used 1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol [3]. In addition, we chose a citric acid-based system for cross-linking of the electrospun nanofibers, which makes our fabrication process compatible to the therapy purposes. After crosslinking, the collagen fibrous scaffold could be easily mounted on a standard device for in vitro studies. This should allow more systematic investigations to elucidate the dependence of cell migration and three-dimensional colonization as a function of pore size and thickness of the scaffold. The fabricated nanofiber scaffolds could also be used for in-vivo testing. Our preliminary results have shown the feasibility of implantation of this patch. Finally, the mechanical stiffness of the scaffold will have to be optimized in order to match that of the heart to be repaired.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-12-RPIB-0015) and by the Fondation de l'Avenir (ET2-658). P.J. was supported by a fellowship from the Fondation Lefoulon Delalande and S.B. from the Conseil Régional d'Ile de France (DIM Biothérapies). M.K. would like to thank Ms. Anne-Laure Vayssade from Microfluidique, MEMs and Nanostructures Laboratory of ESPCI for allowing her using their contact angle measurement instrument.

References

- [1] P. Menasché, V. Vanneaux, J.-R. Fabreguettes, A. Bel, L. Tosca, S. Garcia, V. Bellamy, Y. Farouz, J. Pouly, O. Damour, M.-C. Périer, M. Desnos, A. Hagège, O. Agbulut, P. Bruneval, G. Tachdjian, J.-H. Trouvin, J. Larghero, *Eur. Heart J* (2014).
- [2] D. Castellano, M. Blanes, B. Marco, I. Cerrada, A. Ruiz-Saurí, B. Pelacho, M. Araña, J.A. Montero, V. Cambra, F. Prosper, P. Sepúlveda, *Stem Cells Dev.* 23 (13) (Jul. 2014) 1479–1490.
- [3] S.A. Sell, M.J. McClure, K. Garg, P.S. Wolfe, G.L. Bowlin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (12) (2009) 1007–1019.
- [4] S. Corda, J.L. Samuel, L. Rappaport, *Heart Fail. Rev.* 5 (2) (Jun. 2000) 119–130.
- [5] J.A. Matthews, G.E. Wnek, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, *Biomacromolecules* 3 (2) (Mar. 2002) 232–238.
- [6] G.P. Huang, S. Shanmugasundaram, P. Masih, D. Pandya, S. Amara, G. Collins, T.L. Arinze, J. Biom. Mater. Res. A (1–1) (2014).
- [7] B. Dong, O. Arnoult, M.E. Smith, G.E. Wnek, *Macromol. Rapid Commun.* 30 (7) (Apr. 2009) 539–542.
- [8] Q. Jiang, N. Reddy, S. Zhang, N. Roscioli, Y. Yang, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101 (5) (May 2013) 1237–1247.
- [9] A. Parlakian, C. Charvet, B. Escoubet, M. Mericskay, J.D. Molkentin, G. Gary-Bobo, L.J. De Windt, M.-A. Ludosky, D. Paulin, D. Daegelen, D. Tuil, Z. Li, *Circulation* 112 (19) (Nov. 2005) 2930–2939.
- [10] S.C.A. Dubowitz V, *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. Saunders Ltd., 2006.
- [11] A.J. Clegg, D.A. Scott, E. Loveman, J.L. Colquitt, P. Royle, J. Bryant, *Eur. Heart J.* 27 (24) (Dec. 2006) 2929–2938.

Annexe 4



Nanofibrous clinical-grade collagen scaffolds seeded with human cardiomyocytes induces cardiac remodeling in dilated cardiomyopathy



Pierre Joanne ^{a,1}, Maria Kitsara ^{b,1}, Solène-Emmanuelle Boitard ^{a,1}, Hany Naemetalla ^{c,d}, Valérie Vanneau ^{e,f}, Mathieu Pernot ^g, Jérôme Larghero ^{e,f,j}, Patricia Forest ^h, Yong Chen ^b, Philippe Menasché ^{c,i,j}, Onnik Agbulut ^{a,*}

^a Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, 75005, Paris, France

^b Ecole Normale Supérieure-PSL Research University, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 8640, PASTEUR, 75005, Paris, France

^c Université Sorbonne Paris Cité, Univ Paris Descartes, INSERM U970, 75015, Paris, France

^d Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiology, 75015, Paris, France

^e Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Louis, Unité de Thérapie Cellulaire, 75010, Paris, France

^f INSERM UMR 1160, Centre d'Investigation Clinique en Biothérapies (CIC1427), 75010, Paris, France

^g Institut Langevin, ESPCI ParisTech, PSL Research University, UMR 7587 CNRS, U979 INSERM, Paris, France

^h Biom'Up, 69800, Saint-Priest, France

ⁱ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiovascular Surgery, 75015, Paris, France

^j Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2015

Accepted 29 November 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

Cardiomyopathy

Cardiac cell therapy

Induced pluripotent stem cells

Collagen scaffold

Electrospinning

ABSTRACT

Limited data are available on the effects of stem cells in non-ischemic dilated cardiomyopathy (DCM). Since the diffuse nature of the disease calls for a broad distribution of cells, this study investigated the scaffold-based delivery of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CM) in a mouse model of DCM. Nanofibrous scaffolds were produced using a clinical grade atelocollagen which was electrospun and cross-linked under different conditions. As assessed by scanning electron microscopy and shearwave elastography, the optimum crosslinking conditions for hiPS-CM colonization proved to be a 10% concentration of citric acid crosslinking agent and 150 min of post-electrospinning baking. Acellular collagen scaffolds were first implanted in both healthy mice and those with induced DCM by a cardiac-specific invalidation of serum response factor (SRF). Seven and fourteen days after implantation, the safety of the scaffold was demonstrated by echocardiography and histological assessments. The subsequent step of implantation of the scaffolds seeded with hiPS-CM in DCM induced mice, using cell-free scaffolds as controls, revealed that after fourteen days heart function decreased in controls while it remained stable in the treated mice. This pattern was associated with an increased number of endothelial cells, in line with the greater vascularity of the scaffold. Moreover, a lesser degree of fibrosis consistent with the upregulation of several genes involved in extracellular matrix remodeling was observed. These results support the interest of the proposed hiPS-CM seeded electrospun scaffold for the stabilization of the DCM outcome with potential for its clinical use in the future.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular diseases are one of the major causes of mortality

and morbidity in the developed countries. Among these diseases, dilated cardiomyopathy contributes to a large number of patients with heart failure [1]. Despite advances in drug management and interventional procedures, the treatment of dilated cardiomyopathy remains a challenge because, in contrast to the ischemic forms of heart failure which are amenable to palliative procedures like revascularization, valve repair or remodeling operations, the only option here is cardiac replacement once the disease has reached an end-stage of drug refractoriness [1,2]. In spite of its efficacy, heart

* Corresponding author. Institut de Biologie Paris-Seine, UMR CNRS 8256, 7, quai St Bernard (case 256), 75005, Paris, France. Tel.: +33 1 4427 3421; fax: +33 1 4427 5140.

E-mail address: onnik.agbulut@upmc.fr (O. Agbulut).

¹ These authors contributed equally.

transplantation remains associated with major hurdles including organ shortage, complications of immunosuppression, and late graft vasculopathy. Permanent implantation of an assist device as destination therapy may be an alternative but remains also fraught with several complications like neurologic events, gastro-intestinal bleeding and drive line-related infections [3]. In this setting, less invasive approaches like cardiac stem cell therapy would represent a promising therapeutic strategy for this category of heart failure patients.

Stem cell therapy for cardiac repair has been extensively studied in acute myocardial infarction [4–6] and chronic ischemic heart disease [7–9], showing a potential, albeit often marginal, benefit but few studies are available in the context of dilated cardiomyopathy [10–12]. The objective of improving pump function through replenishment of the diseased myocardium by “new” cardiomyocytes (CM), regardless of whether they derive from the grafted cells or from endogenous cardiac stem cells activated by transplant-released biomolecules, has been dramatically boosted by the possibility of generating cardiac cells from human induced pluripotent stem cells (hiPS) [13]. For example, Lian et al. have demonstrated that, by using a timely-defined regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, it is possible to generate CM from various hiPS lines [14]. However, the therapeutic efficacy of stem cell therapy is not only influenced by the cell phenotype but is also critically dependent on the mode of cell transfer [15,16]. From this standpoint, the diffuse nature of the disease in dilated cardiomyopathy represents a sound indication for an extensive coverage of the ventricle by a cell-seeded scaffold, the clinical implementation of which could take advantage of the recent advances in minimally invasive approaches to the heart.

One of the main considerations to be then taken into account in the development of cardiac patch is the role of environmental cues in guiding differentiation events and cell survival [17,18] which mandates a material as biomimetic as possible. We therefore selected collagen which is both the most abundant protein of cardiac extra-cellular matrix [19,20] and a highly biocompatible polymer. Collagen fibers are also capable of force transmission and signaling via their mechanical and biological properties.

Thus, electrospun nanofibrous collagen scaffolds represent a very promising option to deliver iPS-CM to the heart [21]. Electrospinning is an established nanotechnology technique for fabricating nanofibers by electrically charging a polymeric solution and has been extensively used for the fabrication of biomaterial scaffolds for tissue engineering [22–24].

In a recent work, we have demonstrated the feasibility of obtaining electrospun collagen scaffolds with biologically-compatible solvents and cross-linking agents [25]. In the present study, we leveraged these previous data to generate nanofibrous collagen scaffolds seeded with hiPS-CM and epicardially delivered these scaffolds in a mouse model of dilated cardiomyopathy based on the cardiac-specific and tamoxifen-inducible inactivation of serum response factor (SRF). Care was taken to use a collagen which is clinically validated to improve the clinical relevance and translatability of the generated data. The *in vivo* results of the current work indicated the feasibility of the proposed hiPS-CM seeded electrospun scaffold for the stabilization of the DCM outcome with potential for its clinical use in the future.

2. Methods

2.1. Electrospinning

Clinical-grade atelocollagen in the form of dry material was provided by Biom'Up (Saint-Priest, France). The raw product was dissolved using a bioacceptable solvent system based on ethanol,

water and salts [26]. For the cross-linking of the collagen scaffolds, a system containing citric acid (CA), glycerol as the extending agent and sodium hypophosphite (SHP) as a catalyst was used [27]. Different concentrations of CA and SHP were studied: 5% CA with 2.5% SHP and 10% CA with 5% SHP (weight percentage based on the weight of collagen). The final solution was electrospun by applying 13.5 kV voltage between the syringe needle and the collector (flow rate: 1 ml/h, distance to collector: 5 cm, temperature: 20 ± 2 °C). After electrospinning, a post-treatment cross-linking was applied to the scaffolds by baking them at 150 °C for three different periods (90, 120 or 150 min). For more details, see [Supplemental Materials](#). Circular dichroism was used to study denaturation of collagen after the electrospinning. Scanned electron microscopy was used to visualize the structure of the generated scaffolds. These two methods are described in the [Supplemental Materials section](#).

2.2. Elasticity measurements

The ShearWave™ Elastography imaging mode is a real time ultrasound imaging mode that quantitatively measures elasticity in soft tissue [28]. The principle of ShearWave™ Elastography relies on imaging at very high frame rate (5000 images/s) the propagation of a shear wave remotely induced by the acoustic radiation force. The shear modulus map is then derived directly from the local shear velocity measured in the sample. A 15 MHz central frequency ultrasound transducer connected to an AixPlover® ultrasound scanner (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France) was used for this purpose. Real-time B-mode imaging was used to measure the thickness of the samples. Shear wave propagation speed was calculated from scaffolds in aqueous solution. A color-coded, real-time shear wave elastography map could then be produced to quantitatively assess the shear velocity. A correction was applied on the shear velocity to take into account the wave guided effect in thin wall as in Ref. [29] and finally obtain quantitative values of the Young's modulus.

2.3. Cells

The human episomal iPS cell line (hiPS, Life Technologies, Saint-Aubin, France) was used in this study from passage 4 to passage 10 and cultured as indicated in the manufacturer's instructions. Details are provided in the [Supplemental Materials section](#). Neonatal rat cardiomyocytes were purified as described in that same section. Two-hundred thousand cells were seeded on a collagen scaffold maintained with a CellCrown™ (Scaffdex, Tampere, Finland) in a 24-well plate and after three days of culture, the cells were fixed and immunolabeled with Nkx2.5 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and α -actinin (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) antibodies to determine the percentage of cardiomyocytes.

2.4. hiPS cardiac differentiation

To obtain a sufficient amount of cells for differentiation, a cryovial of hiPS cells was thawed and amplified for two passages on Matrigel® hESC-Qualified Matrix (Corning Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands), in mTeSR™1 medium (Stemcell Technologies, Grenoble, France) as described previously [14,30]. Cells were then differentiated using the GiWi protocol [14] at 37 °C and 5% CO₂. Briefly, cells were detached using accutase (StemPro®-Accutase® Cell Dissociation Reagent; Life Technologies) and counted. Undifferentiated cells were seeded on Matrigel® hESC-Qualified Matrix coated wells of a 6-well plate (2.4×10^6 cells/well) in mTeSR™1 supplemented with 5 μ M of Y27632 (ROCK inhibitor, Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) and cultured during 3

additional days with daily replacement of mTeSR™1. Cardiac differentiation was then initiated by reverting the medium to RPMI (Life Technologies) enriched with 2% insulin-free B27 supplement (Life Technologies) and 10 μ M CHIR99021 (Selleckchem, Houston, TX, USA). This medium was replaced with RPMI supplemented with B27 minus insulin after 24 h. Two days later, the medium was half exchanged for fresh RPMI-B27 minus insulin containing 5 μ M of IWP2 (Tocris Bioscience) for 48 h. Seven days after the addition of CHIR99021, the medium was replaced by RPMI enriched with 2% B27 supplement, and the very first beating cell clusters were observed the day after. At day 15, cells were thus recovered with accutase, passed through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and counted. Purity was confirmed by cytometry (see [Supplemental Methods](#)). Then, 10⁶ cells were seeded on a collagen scaffold fixed to a CellCrown™ (Scaffdex) in a 24-well plate with RPMI supplemented with 2% B27. After two days, the medium was changed and, one day later, the scaffold was removed and grafted on the heart of mice.

2.5. Animals

All procedures were approved by our institutional Ethics Committee and complied with the European legislation (Directive 2010/63/EU) on animal care. In this study, a total of 56 mice were used, which included 32, 6 to 9-month-old conditionally invalidated serum response factor α MHC-MerCreMer:Sf/Sf [31] mice and 24 C57BL6 mice. The Cre-mediated excision of floxed serum response factor (SRF) alleles in the heart was induced by daily intraperitoneal tamoxifen (20 μ g/g/day; Sigma–Aldrich) injections on 3 consecutive days. Mice were grafted three weeks after the last tamoxifen administration.

2.6. Epicardial grafting

Animals underwent a left lateral thoracotomy after intraperitoneal ketamine (100 mg/kg; Merial, Gerland, France)-xylazine (10 mg/kg; Bayer, Puteaux, France) anaesthesia and tracheal ventilation. Analgesia was performed for 2 days after surgery with a 2 mg/kg intraperitoneal injection of profenid® (Merial). Collagen scaffolds (surface approximately 200 mm²) were sutured on the ventricles of 24 healthy C57BL6 and 26 α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice. Six additional α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice (Sham) underwent the same procedure without scaffold implantation and served as sham-operated controls. All α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice were daily treated with cyclosporine A (10 mg/kg/day, intraperitoneal; Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France) until the echocardiographic assessment of heart function at 14 days after the implantation. C57BL6 mice were sacrificed 7 days after treatment to assess the biocompatibility of collagen scaffold. All mice were sacrificed by cervical dislocation and then hearts were removed, the left ventricle apexes were dissected and flash-frozen in liquid nitrogen for subsequent RNA isolation. The remaining hearts were embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane until they were sliced into 10 μ m thick cryosections for histology and immunostaining (see [Supplemental Methods](#)).

2.7. Cardiac function

Pre- and post-transplantation cardiac function was evaluated by transthoracic echocardiography (Sequoia 516, equipped with a 13 MHz phased-array linear 15L8 probe; Siemens, Saint-Denis, France) in animals sedated with 2% isoflurane. Two-dimensional parasternal long-axis views were used to measure the left ventricular end-diastolic and systolic volumes (LVEDV and LVESV,

respectively). Ejection fraction (EF) was calculated as described previously [9]. All measurements were made online on freeze frame images in triplicate and averaged by an investigator blinded to the treatment group.

2.8. Gene expression

Details of the procedure and sequences of primers used are available in [Supplemental Methods](#).

2.9. Statistics

Groups were statistically compared using analysis of variance (ANOVA). If necessary, post-hoc analysis was performed using Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test in R software. For groups that did not pass tests of normality (Shapiro–Wilk) and equal variance (Bartlett or Fisher), non-parametric tests were used (Kruskal–Wallis) and multiple comparison were driven using the Dunn procedure and multivariate normal distribution in R software. Values are given as means \pm SEM. All outcome measurements were made blindly.

3. Results

3.1. Physical characteristics of collagen scaffolds

After electrospinning and cross-linking under different conditions of CA concentration and baking time, the structure of the different scaffolds was checked by scanning electron microscopy (Fig. 1A–B). A nanofibrous structure was observed in all tested conditions without major structural differences between them ([Supplemental Figs. S1 and S2A–B](#)). Then, the effect of the solution preparation and electrospinning on the denaturation of collagen was studied by circular dichroism. Our results demonstrated that after the electrospinning process the fraction of the folded collagen is approximately 70% ([Supplemental Fig. S2C](#)).

The scaffold parameters were further evaluated from scanning electron microscopy images. The fiber thickness for all the different cross-linking conditions ranged from 0.6 to 2.2 μ m with an average porosity of 2–3 μ m. No differences between the cross-linking conditions were observed. The maximum porosity was close to 7 μ m.

Shear wave elastography was used for measuring the thickness and elasticity of the collagen scaffolds. The thickness of the different collagen scaffolds was 400 \pm 50 μ m. Their stiffness, evaluated as the Young's modulus, increased with the CA concentration and the baking time (Fig. 1C) and peaked for the 10% CA with 150 min-baking condition (10.1 kPa).

3.2. Biocompatibility of collagen scaffolds

The biocompatibility of the different collagen scaffolds was studied both *in vivo* (grafting of scaffolds in C57BL6 mice) and *in vitro* (seeding of scaffolds with neonatal rat cardiomyocytes). Thus, to first assess the biocompatibility of the electrospun collagen construct in a cardiac environment, we grafted acellular scaffolds on the surface of the heart of 24 healthy C57BL6 mice. After 7 days, the hearts were explanted and analyzed. Hematoxylin–eosin staining showed that the collagen scaffolds were macroscopically visible in all conditions (Fig. 2A) with evidence for some degradation manifest as pores in the scaffold (Fig. 2B, [Supplemental Fig. S3](#)). Quantification of this porosity (Fig. 2C) indicated that, despite the lack of significant differences, cross-linked scaffolds baked during 150 min seemed to present less degradation than those processed under the other conditions. This is also supported by the finding

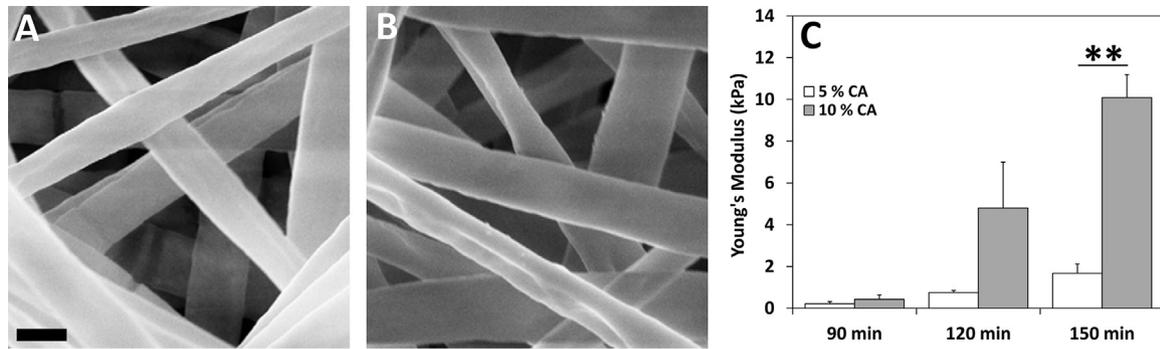


Fig. 1. Electrospun collagen scaffold structure and stiffness. (A–B) Scanning electron microscopy images of 5% (A) or 10% (B) CA-cross-linked collagen scaffold baked at 150 °C for 150 min. (C) Stiffness (Young's Modulus) of the different collagen scaffolds evaluated by Shear Wave Elastography. CA, citric acid. Scale bar: 1 μ m (A–B). ***p*-value < 0.01.

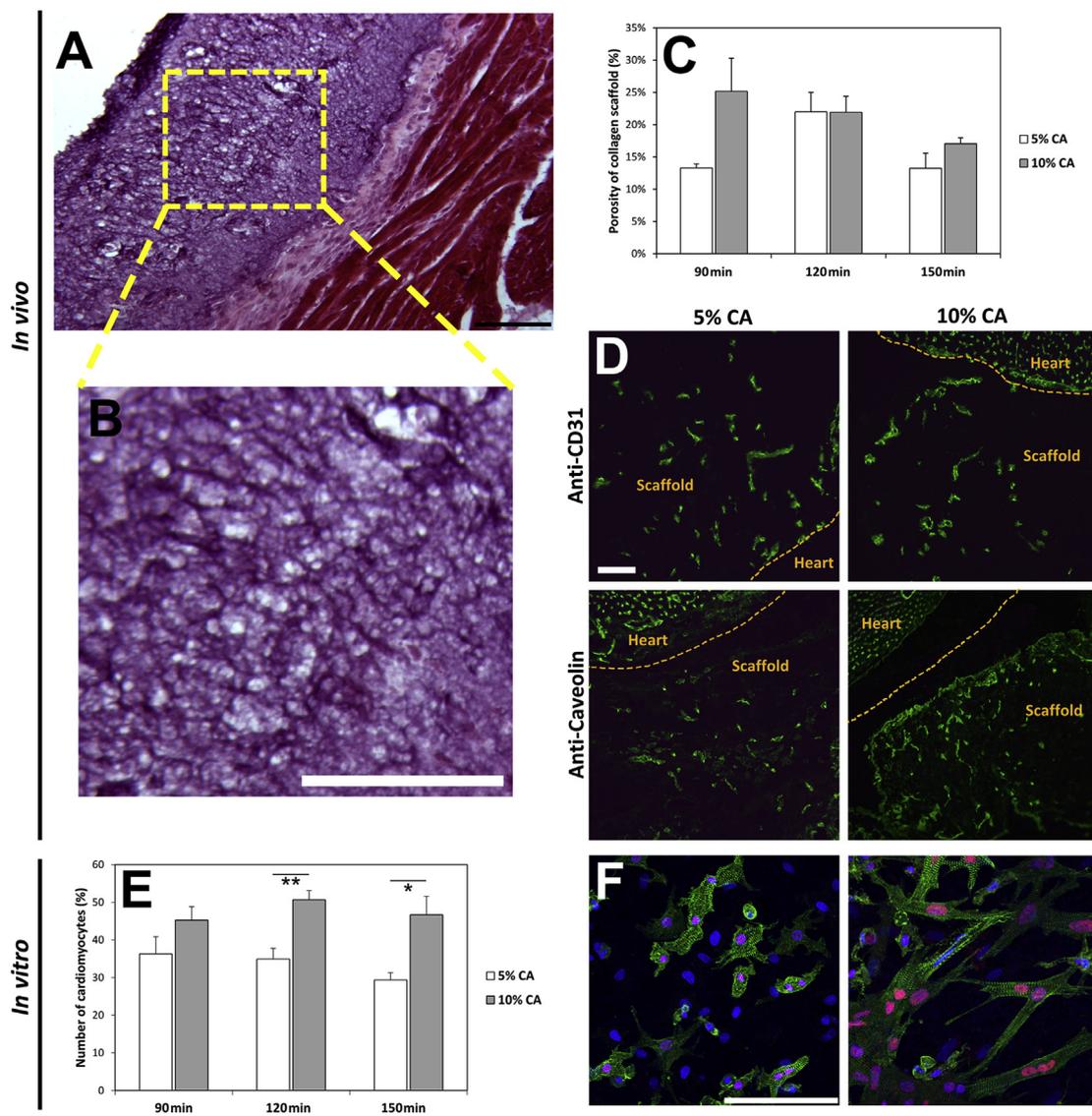


Fig. 2. Biocompatibility of collagen scaffolds: *in vivo* (A–D) and *in vitro* (E–F) assessments. (A–D) 5% and 10% CA collagen scaffolds were epicardially delivered on the surface of the heart of healthy C57BL6 mice ($n = 24$). After 7 days, the hearts were explanted and analyzed. (A–B) Representative images of hematoxylin-eosin staining of a heart section seven days after implantation. (C) Post-implantation porosity of scaffolds as a marker for their resistance and degradability. (D) Capillary infiltration in scaffold assessed by CD31 and caveolin-1 α immunolabelings. (E–F) *In vitro* biocompatibility was tested with neonatal rat cardiomyocytes. (E) Immunostaining against α -actinin (green) and Nkx2.5 (red); nuclei appear blue due to Hoescht 33342 staining. (F) Number of cardiomyocytes on the scaffolds, expressed as a percentage of total cells, after 3 days of culture and immunolabeling against α -actinin, CA, citric acid. Scale bar: 100 μ m (A, B, D, F). **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01.

that scaffolds baked during 150 min were found in all animal tested unlike those undergoing a shorter baking time ($n = 4$ per group, a total 6 groups, data not shown). Furthermore, in all conditions tested, numerous blood vessels were identified within the scaffold and in the underlying myocardium in close proximity to the scaffold, as evidenced by positive CD31 and caveolin-1 α stainings (Fig. 2D). The biocompatibility of electrospun collagen nanofibers was further supported by *in vitro* experiments using neonatal rat cardiomyocytes (Fig. 2E–F). As shown in Fig. 2F, not all cells were positive for α -actinin or Nkx2.5, which is consistent with the remaining presence of contaminating fibroblasts in the cell culture. The quantification of the ratio between cardiomyocytes and non-cardiomyocytes after 3 days of culture (Fig. 2E) indicated, however, that collagen scaffolds cross-linked with 10% CA allowed a greater colonization of the construct by cardiac cells. Moreover these cardiac cells were larger and wider, with a better-looking morphology and a more organized sarcomeric structure (Fig. 2F). Put together, these data led to conclude that 10% CA-based cross-linking was the best condition for generating collagen scaffolds for cardiac cell therapy applications.

3.3. Lack of deleterious effects of acellular collagen scaffolds on heart function

To complete the biocompatibility testing, we then assessed whether collagen scaffolds could have a deleterious effect on heart function. To this end, 10% and 5% CA-cross-linked collagen cell-free scaffolds were epicardially delivered in the α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mouse model of dilated cardiomyopathy ($n = 18$). Fourteen days after delivery (35 days after tamoxifen injection), LVEDV, LVESV and EF were measured. At this time point, tamoxifen treated α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice exhibited impaired cardiac function. As shown in Fig. 3, no statistical differences in cardiac function were observed between sham-operated mice and mice treated with 5% or 10% ($n = 6$ per group) CA acellular collagen scaffolds (Fig. 3A–C). Likewise, no differences were observed in the expression of the hypertrophic markers beta-myosin heavy chain (β -MHC), atrial natriuretic factor (Anf) and brain natriuretic peptide (Bnp) (Fig. 3D–F). These results thus confirmed that, under our conditions of material processing, electrospun collagen scaffolds did not adversely affect heart function.

3.4. Improvement of cardiac function by human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes seeded on collagen scaffolds

Based on the previous results, a collagen scaffold cross-linked with 10% CA was selected for seeding with cardiomyocytes-derived from hiPS. More than 70% of cells expressing cardiac troponin, as demonstrated by flow cytometry, were obtained after 15 days with the biphasic activation/inhibition of the Wnt pathway differentiation protocol [14] (see Fig. 4A–B). These cells were cultured for 3 days onto the scaffold. As seen in Fig. 4C, the cells colonized the 10% CA collagen scaffold featuring a regular distribution of the sarcomeric protein α -actinin. Of note, contraction of the scaffold could be observed (see Supplemental Data video 1), indicating a functional colonization and a good compatibility between the hiPS-CM and their collagen support. These scaffolds were then epicardially delivered in 8 α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice three weeks after tamoxifen induction. Six acellular collagen scaffolds (10% CA) were used as controls. Baseline functional parameters did not differ significantly between the two groups ($p > 0.05$). In contrast, as demonstrated in Fig. 4, at sacrifice (14 days after implantation), all functional parameters including LVESV, LVEDV and EF significantly differed between the two groups ($p < 0.001$). There was a marked increase in LVESV and LVEDV over baseline in

mice treated with the cell-free scaffolds ($36.04 \pm 0.84 \mu\text{L}$ vs $27.81 \pm 0.64 \mu\text{L}$, $p = 0.001$; $51.77 \pm 1.50 \mu\text{L}$ vs. $44.41 \pm 0.81 \mu\text{L}$, $p = 0.003$, respectively). In contrast, mice treated with the 10% CA scaffold + hiPS-CM demonstrated stable values of these functional parameters throughout the experimental time course ($22.32 \pm 1.73 \mu\text{L}$ at sacrifice vs $25.38 \pm 1.09 \mu\text{L}$ at baseline for LVESV, $p = 0.28$; $41.28 \pm 1.24 \mu\text{L}$ vs $43.33 \pm 1.20 \mu\text{L}$, respectively for LVEDV, $p = 0.78$). EF featured similar patterns (Fig. 4F). This improvement was associated with the strong decrease in the expression of β -MHC and an increased expression of cardiac actin ($p = 0.044$) (Fig. 4G).

3.5. Improvement of the scaffold vascularization induced by cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells

To decipher the mechanisms behind the improvement of heart function, we first tried to find human cells in the heart of mice or in implanted scaffolds. However, no human cells were observed 14 days after transplantation (data not shown), indicating that the effects observed were likely due to activation of signaling pathways in the recipient's heart in response to the transplanted cells. As shown in Fig. 5, there was a strong increase in the number of CD31-positive cells in the cellularized collagen scaffold compared to the acellular one (Fig. 5A, B and D). Interestingly, mice treated with the hiPS-CM-loaded scaffold demonstrated a significant increase in SRF gene expression ($p = 0.01$, Fig. 5C), consistent with the increase in CD31-positive cells that are known to express SRF. There were no obvious histological patterns of a xenogeneic immune response to the delivered human iPS cardiac derivatives, as evidenced by the lack of difference in the extent of macrophage and T-lymphocyte infiltration between the cell-free and the cell-loaded scaffolds groups 14 days after treatment (data not shown).

3.6. Cardiac cells derived from human pluripotent stem cells induce a closer adherence of the scaffold to the heart

As shown by hematoxylin-eosin and Sirius red stainings in Fig. 6, implanted collagen scaffolds were visible at the surface of the heart 14 days after transplantation in both groups. However, a closer analysis demonstrated some differences between the two groups. As shown in Fig. 6A and B, a thin layer of interstitial cells were found between the surface of the heart and the cell-free scaffold whereas these cells were not detectable following implantation of the cell-loaded scaffold (Fig. 6C and D) which thus appeared more closely adherent to the implantation area. This closer contact of the cellularized collagen construct with the host myocardium, as compared with the cell-free scaffold, could have allowed the seeded cells to more effectively control the expected procedure-induced inflammatory response and its attendant fibrotic sequelae, thereby accounting for the above mentioned reduction in ventricular volumes. This hypothesis is actually consistent with a marked, albeit not significant, treatment-induced increase in the expression of several genes implicated in the regulation of extracellular matrix such as osteopontin, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), thymus cell antigen-1 (Thy1), collagen 3a1 and collagen 1a1 (Fig. 6F).

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.035>.

4. Discussion

The main result of this study is that epicardial delivery of an electrospun collagen scaffold seeded with hiPS-CM improves the functional outcomes of non-ischemically dilated mouse hearts. The scaffold was well integrated into the host myocardium but the

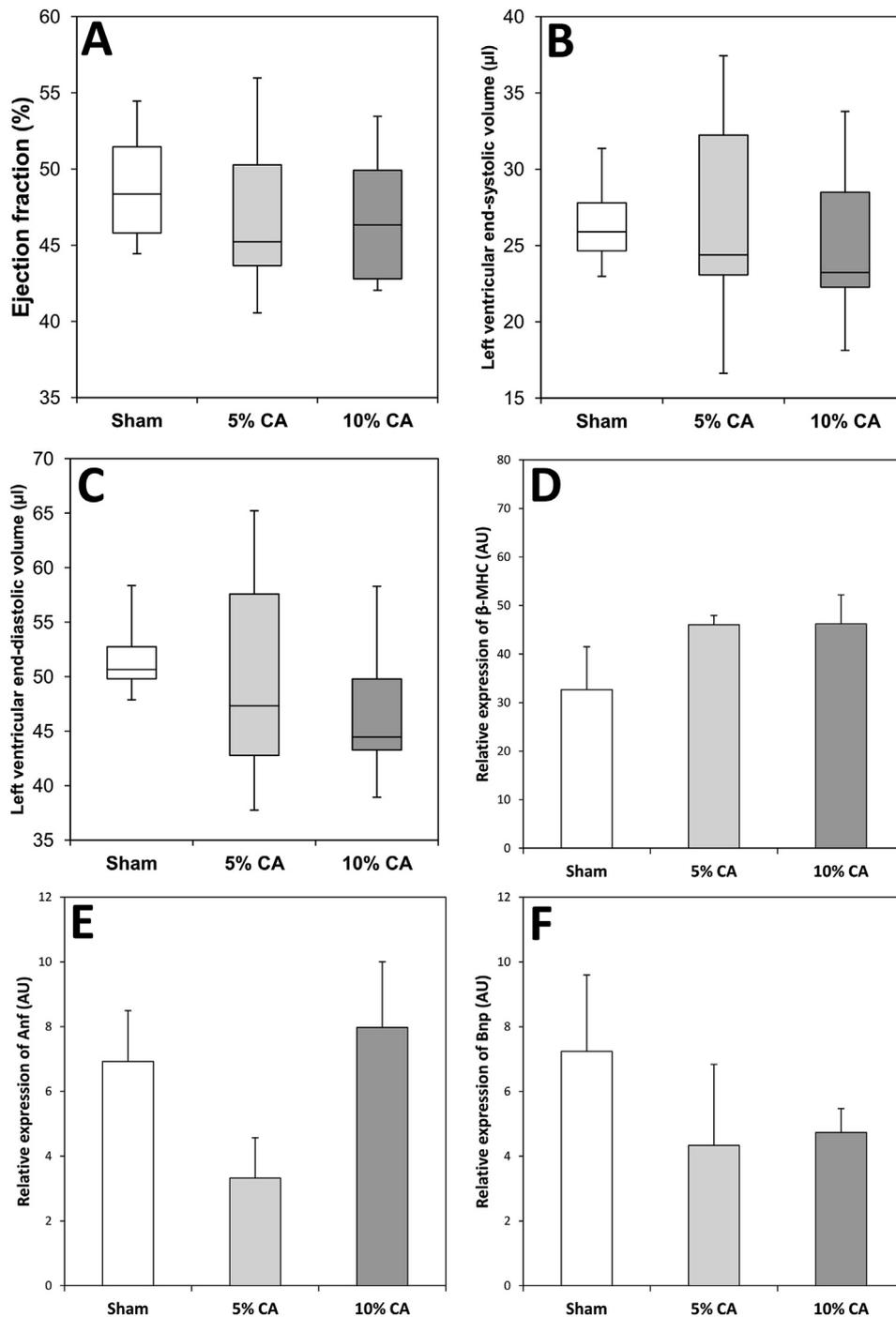


Fig. 3. Lack of adverse functional effects of acellular collagen scaffolds. Assessment, at 14 days after implantation in a non-ischemic dilated α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice, of left ventricular ejection fraction (A), left ventricular end-systolic volume (B), left ventricular end-diastolic volume (C) and gene expression of β -MHC (D), Anf (E) and Bnp (F).

hiPS-CM that it initially harbored were no longer detectable after 14 days and are thus postulated to have acted paracrinally on endogenous repair pathways, as suggested by the increased vascularity and potentiated integration of the scaffold compared with hearts receiving the cell-free collagen patch.

Non-ischemic dilated cardiomyopathy is characterized by the loss of a critical number of cardiomyocytes causing a decrease of myocardial contractility [1] and a compensatory cardiac remodeling which may ultimately result in heart failure [32]. Unlike ischemic cardiac diseases, dilated cardiomyopathy is not amenable

to palliative procedures like coronary artery revascularization or mitral valve repair and, indeed, now exceeded coronary artery disease as an indication for heart transplantation (55% vs 36%) in the last report of the International Society for Heart and Lung Transplantation [33]. There is thus a robust rationale for investigating new therapies, among which stem cells may hold some promise. Even though cell therapy is unlikely to afford a total replacement of the diffusely diseased tissue with “new” cardiomyocytes, it could still be efficacious by harnessing endogenous repair pathways via mitigation of adverse remodeling, increased

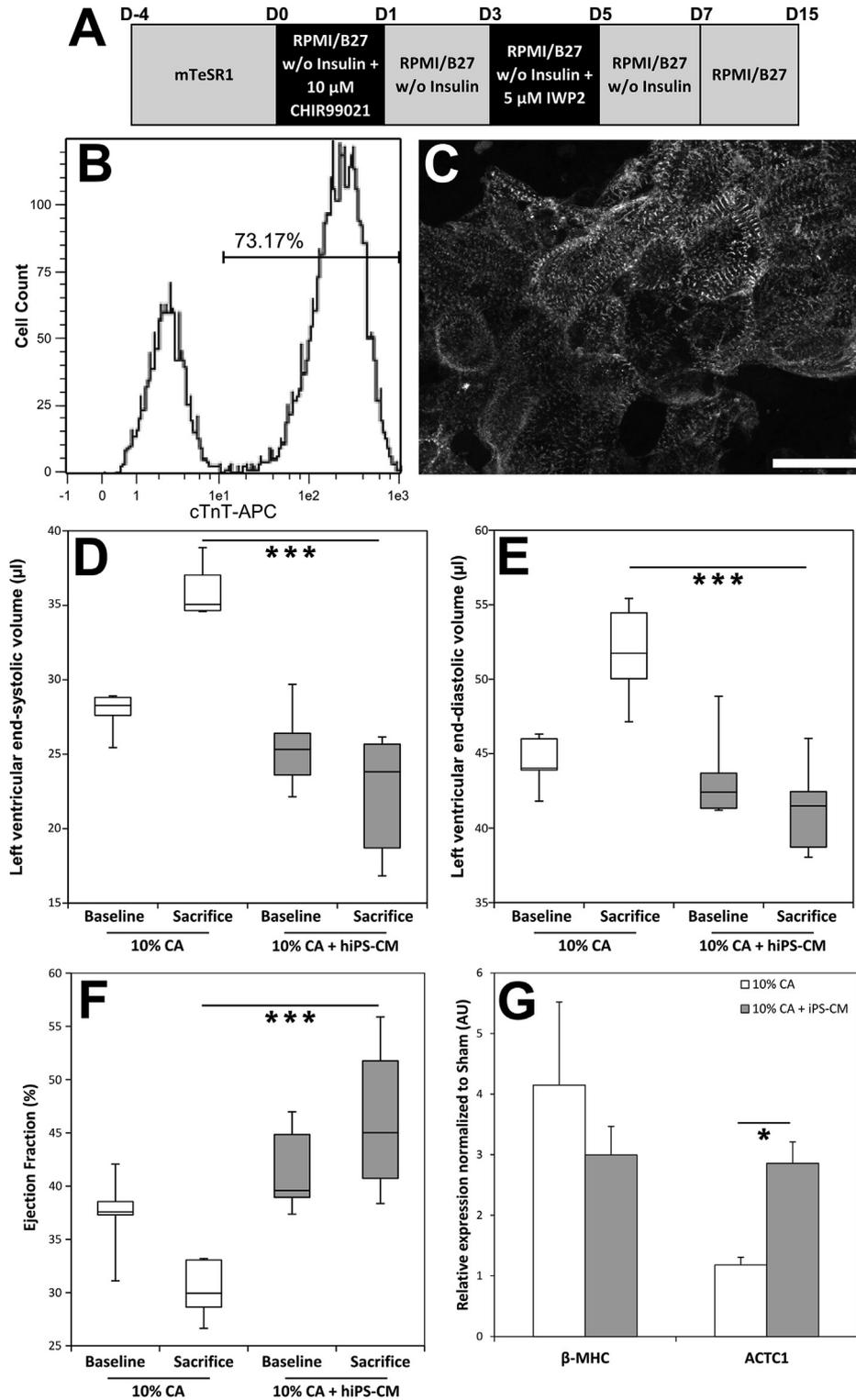


Fig. 4. Improvement of cardiac function in a non-ischemic dilated α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mouse model following epicardial implantation of the cellularized collagen scaffold. 10% CA collagen scaffold was seeded with cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cell (hiPS-CM) and cultured for 3 days. (A) Schematic representation of the cardiac specification protocol used to obtain cardiomyocytes from hiPS cells. (B) Flow cytometry showing that after 15 days of cardiac differentiation, more than 70% of hiPS cell-derived cells are positive for cardiac troponin T (cTnT). (C) Immunolabeling against α -actinin of hiPS-CM seeded onto a 10% CA collagen scaffold for 3 days. Note the *bona fide* structure of the cardiomyocytes on the scaffold. (D–G) Cellularized scaffolds (10% CA + hiPS-CM) were epicardially delivered in 8 immunosuppressed α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice. Six cell-free 10% CA collagen scaffold-implanted mice were used as controls. Fourteen days after implantation, left ventricular end-systolic volume (D), left ventricular end-diastolic volume (E) and ejection fraction (F) were evaluated. Note the significant improvement of heart function in mice receiving the cellularized collagen scaffolds. (G) Relative expression, normalized to sham, of mRNA by real-time PCR for some stress-induced genes. β -MHC, beta-myosin heavy chain; ACT1, cardiac α actin; cTnT, cardiac troponin T; CA, citric acid; hiPS-CM, cardiomyocyte-derived from human induced pluripotent stem cells. Scale bar: 30 μ m (C). **p*-value < 0.05, ****p*-value < 0.001.

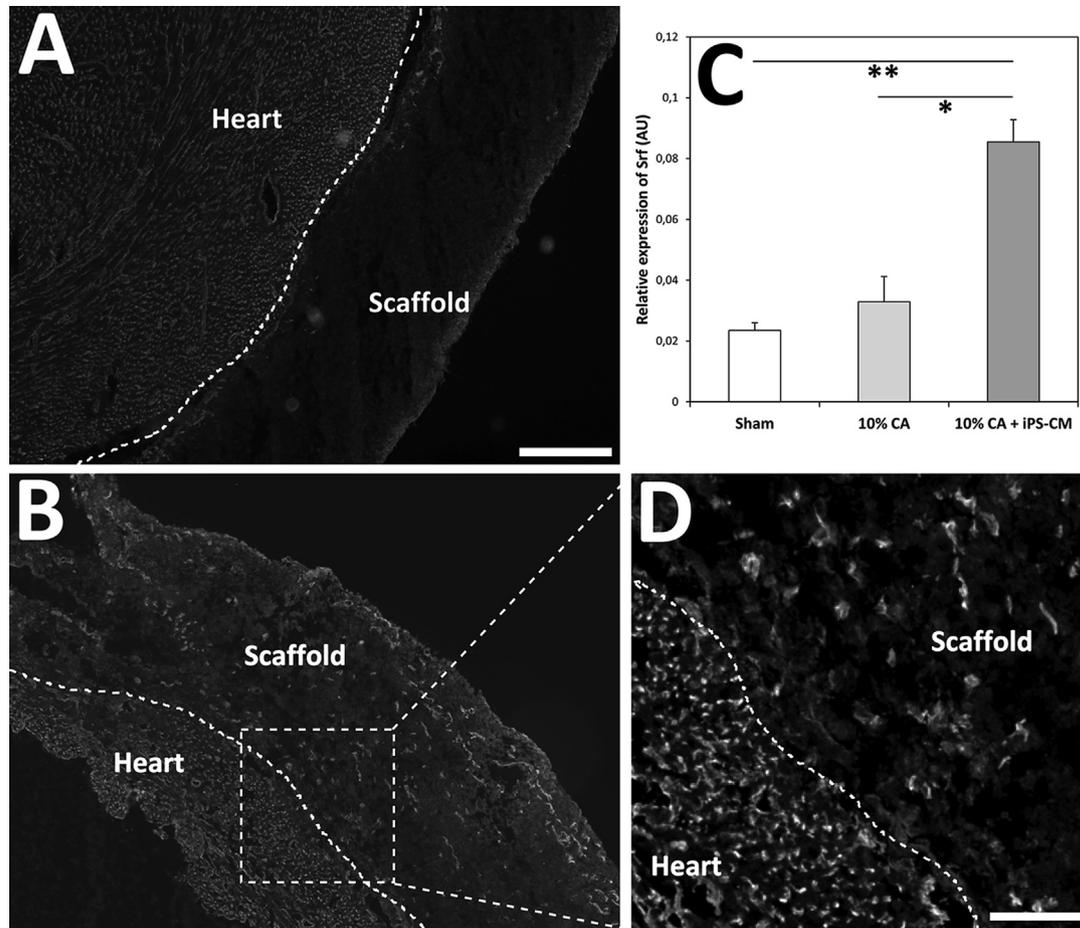


Fig. 5. Capillary density (A, B and D) and serum response factor expression (C) in treated mice. (A–B, D) Capillary infiltration, as assessed by CD31 immunolabeling in 10% CA (A) and 10% CA + hiPS-CM-treated animals (B). (C) Relative quantification of mRNA level by real-time PCR of the SRF gene. Scale bars: 250 μ m (A–B), 80 μ m (D). **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01.

angiogenesis or activation of resident stem cells [34]. Furthermore, usual needle-based multiple intramyocardial injections may not be the most suitable mode of cell transfer because of the diffuse nature of the disease while this hurdle could be overcome by the epicardial delivery of a cell-loaded scaffold “wrapping” a large area of the left ventricle and potentially delivered through a minimal access procedure. Beyond the provision of reparative cells, such a tissue-engineered construct could also be useful by mechanically supporting the heart, thereby limiting its adverse remodeling [35]. Putting these data together led to the design of the present study entailing the evaluation of an engineered collagen patch loaded with hiPS-CM.

Several natural and synthetic polymers have been investigated as tissue-engineered cardiac constructs. Among them, collagen features distinct advantages. It is an essential component of myocardial connective stroma, which is largely composed of type I and III fibrillar collagen [19] and its arrangement may contribute to preserve heart microarchitecture and chamber geometry. Actually, several reports have emphasized that the architecture of myocardial collagen fibers, in particular of the endomyocardium, may be involved in the regulation of the mechanical activity of the heart [36,37]. In addition, collagen can interact with most cell types to promote their adhesion, survival and growth. Finally, collagen has a long-standing safety record for medical applications, which should streamline translational processes towards the clinics. For all these reasons, we selected collagen as the patch material and used

electrospinning to generate biomimetic nanofibrous scaffolds intended to recapitulate extracellular matrix properties [21]. Like in our previous study [25], care was taken to use a clinically validated atelocollagen, which is more soluble, less antigenic and more biocompatible than native collagen, collagen peptide or gelatin, and to rely on biocompatible solvents. This resulted in a post-electrospinning denaturation rate of 30%, which is in good agreement with previously reported studies on the effect of the electrospinning process on the collagen structure [27]. Different post-electrospinning cross-linking conditions were then tested to modulate the stiffness of the collagen scaffolds. The best combination was obtained with 10% of CA and 150 min of baking at 150 °C, which resulted in an elasticity modulus of 10.1 kPa. It should be noted that the elasticity modulus of native heart tissue is in the range of 10–15 kPa [38] while the elasticity modulus of ischemic tissue, associated with fibrosis, increases around 30–50 kPa [39,40]. Furthermore, Engler et al. [38] using isolating cardiac cells have demonstrated that cardiomyocytes were only able to form mature sarcomeres with regular beating on polyacrylamide gels of about 10 kPa. On softer gels, sarcomeres were less spaced and not fully organized whereas on stiffer gels, myocytes contained more stress fibers and did not display sarcomeres. Thus, the elasticity value of our collagen scaffold falls in the range of those reported for optimizing cardiac tissue regeneration, 10–20 kPa [17], and the suitability of this degree of elasticity for the intended applications is supported by the finding of an interconnecting functional cardiac-

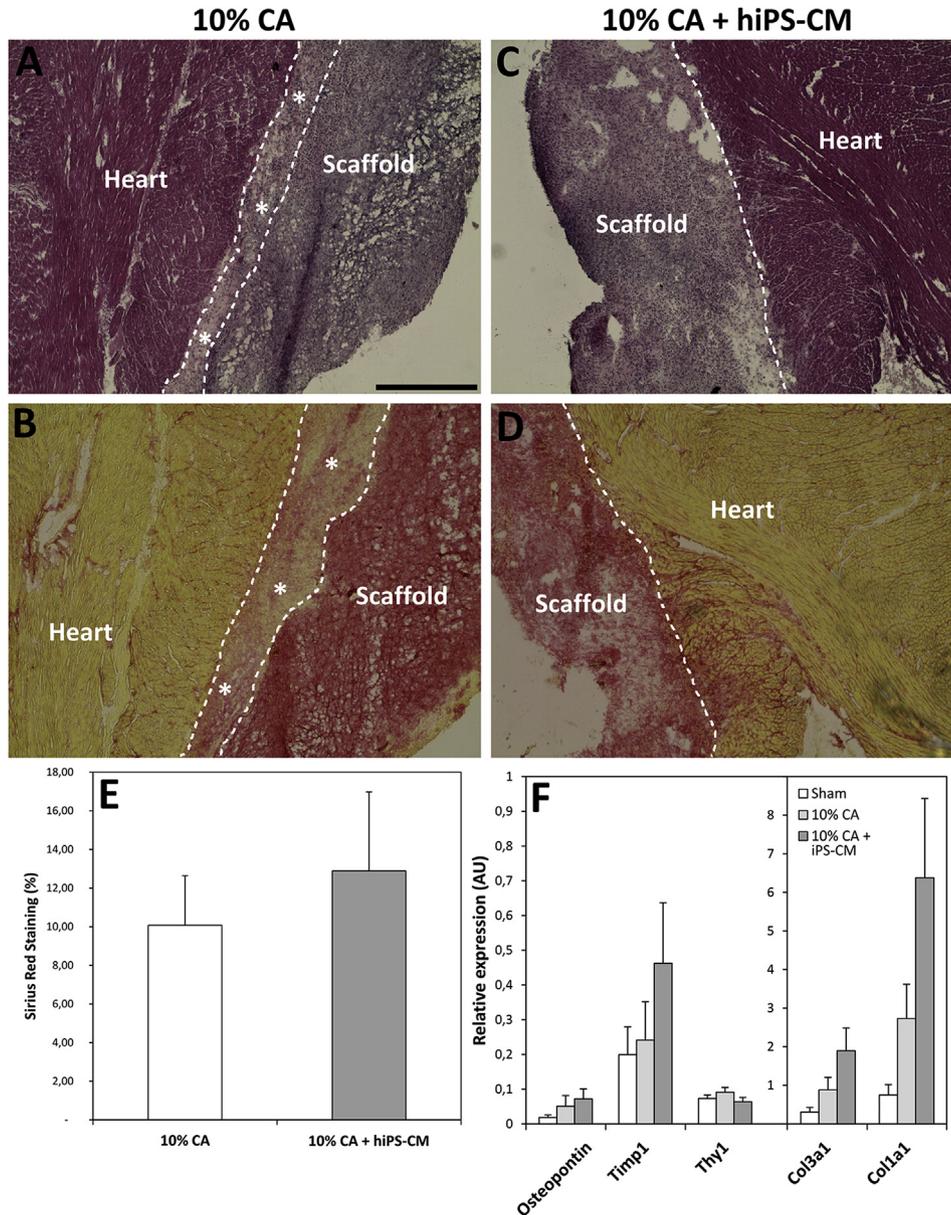


Fig. 6. Effects of scaffold cellularization on its relationship with the underlying myocardium. Hematoxylin-eosin (A, C) and Sirius red (B, D) staining of 10% CA (A–B) and 10% CA + hiPS-CM (C–D) collagen scaffolds after 14 days of implantation. *indicate interstitial infiltration of cells. (E) Quantification of the area of positive staining for Sirius red relative to the total area of the left ventricular section. (F) Relative quantification of mRNA levels by real-time PCR for some genes involved in remodeling of the extracellular matrix. Timp1, tissue inhibitor of metalloproteinase 1; Thy1, thymus cell antigen-1; Col, Collagen. Scale bar: 400 μ m (A–D).

like tissue three days after the cardiomyocytes had been seeded onto the scaffold (Fig. 2E and Fig. 4C and Supplemental Video 1).

The next issue was the choice of the cells to be grafted. Although there is not yet a consensus regarding the identity of the “ideal” cell, head-to-head studies suggest that the greatest therapeutic efficacy is obtained by using cells committed to the cardiac lineage, as compared to non-cardiac cells [41–45]. Of note, the superiority of cardiac-committed cells has been demonstrated on the basis of multiple endpoints (engraftment, reduction of infarct size and fibrosis, angiogenesis, improvement in function and limitation of arrhythmias) and might be related to stronger and more target tissue-specific paracrine effects [43]. For this reason, we selected to use hiPS-derived cardiomyocytes which have been shown to recapitulate most, if not all, the molecular, electrophysiological and functional fingerprints of *bona fide* cardiomyocytes. Over the past

years, tremendous improvements have been made in the generation of hiPS-CM by mimicking *in vitro*, developmental pathways normally operating during embryonic cardiogenesis [13] and, in the present study, an efficient cardiomyogenic differentiation of pluripotent hiPS cells could be achieved by a sequential activation/inhibition of the Wnt pathway [14,30]. In keeping with their cardiac phenotype, intramyocardial injections of these cells have been shown to give stable [46], electrically integrated [47] and vascularized grafts [8]. Transplantation of these cells delivered under the form of cell sheets has also been successful in providing functional and electrical recovery of infarcted hearts [48]. However, our past experience with cell sheets has identified potential issues related to their fragility and difficulty in handling. This issue was addressed by using the above-mentioned collagen patch as a cell carrier featuring stronger handling characteristics, including suturability,

and more tunable mechanical properties.

These hiPS-CM-loaded collagen patches were then grafted in a double transgenic mouse model (α MHC-MerCreMer:Sf/Sf) which allows to induce the inactivation of SRF only in cardiomyocytes as tamoxifen-inducible Cre recombinase expression is under the control of the cardiomyocyte-specific alpha myosin heavy chain promoter (α MHC). SRF mRNA and protein levels drastically decrease after tamoxifen injection and mice exhibit a progressive impairment of cardiac contractility, ending up in dilated cardiomyopathy, heart failure, and death within 10 weeks [31,49]. The present results clearly demonstrate the efficacy of the cellularized collagen construct in stabilizing the contractile function of SRF-deficient transgenic mice since, two weeks after patch implantation, LV volumes and EF were significantly improved in treated mice compared with their cell-free counterparts. This functional benefit was paralleled by a PCR-evidenced significant decrease of β -MHC taken as a surrogate marker of heart failure.

However, by the time the functional outcome was found better preserved by the hiPS-CM-loaded patch, the grafted cells were no longer detectable. Such a discrepancy has been repeatedly reported in the literature and cell loss is now attributed to an interplay of multiple factors among which an immune response against hiPS, despite cyclosporine therapy, cannot be eliminated (discussed below). The inability to explain the functional benefits of stem cells by their sustained engraftment has given rise to the paracrine hypothesis whereby biomolecules released by the cells would foster endogenous repair pathways. This hypothesis is indirectly supported by our data, assuming that SRF expression in endothelial cells is unaffected in this model [50]. Thus, the increased expression of SRF in the heart of treated mice could reflect a paracrinally-mediated augmentation of the pool of endothelial cells, which would be consistent with the definite trend towards a greater capillary density in the scaffold and, to a lesser degree, in the neighboring myocardium. Admittedly, however, part of this increased vascularity could be due to the collagen material itself which is known to have intrinsic angiogenic properties [51]. Finally, the cellularized collagen scaffold was associated with the upregulation of several genes involved in the regulation of extracellular matrix remodeling and a trend towards a lesser degree of fibrosis (Fig. 6D–E). In particular, osteopontin has been described as an important regulator of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors during remodeling, resulting in significantly decreased left ventricular dilation after myocardial infarction [52]. In agreement with this observation, the increase in osteopontin expression seen in the treated group was paralleled with that of Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase (Timp)-1 mRNA levels. Of note, the expression of these genes was based on apical heart sections, remote from the scaffold implantation area, which may have led to underestimate their level of upregulation but lends further credit to the release of molecules diffusing from the patch throughout the myocardium. Admittedly, an alternate mechanism whereby the cell-loaded scaffolds improved left ventricular function could be the putative cardioprotective effect of some of the effectors of the xenogeneic immune response expected to occur when human cells are transplanted in a mouse heart [53]. However (1), in an immunodeficient mouse model where no rejection would be expected to occur, transplantation of human pluripotent stem cell-derived early progenitor cells was shown to preserve post-infarction myocardial function whereas fibroblasts, also from human origin, did not [54] (2), in an immunocompetent mouse model, transplantation of human fibroblasts failed to show any functional benefit despite the immune response expected to have occurred in this xenogeneic context [55] (3), a previous study from our laboratory has shown only limited functional benefits of transplantation of allogeneic adipose-derived stem cells [12] while in

the same DCM model, human skeletal myoblasts have equally failed to significantly improve heart function (unpublished data), and (4), in the present experiments, both immunostaining and qPCR failed to demonstrate a noticeable difference in the extent of macrophage and T-lymphocyte infiltration between the cell-free and the cell-loaded scaffolds, thereby suggesting the efficacy of our cyclosporine-based immunosuppression in mitigating the expected xenogeneic immune response. Collectively, these data make unlikely that the functional benefits of the cell-loaded scaffolds could be fully explained by a nonspecific immune response and they rather support that the presence, at least early after scaffold implantation, of the iPS-derived cardiomyocytes directly contributed to the improved outcomes yielded by the cellularized constructs.

Altogether, our data converge to relate these functional benefits of hiPS-CM-loaded electrospun collagen nanofiber patches to the paracrine activation of endogenous repair pathways that still need to be precisely characterized. Likewise, the positive outcome of these constructs requires to be further validated, particularly in a clinically relevant large animal model and alternate cell/material combinations should also be tested. Yet, the present results support the concept that covering the non-ischemically dilated left ventricle with a cellularized scaffold endowed with cardiomyogenic properties could be an effective means of stabilizing the disease, thereby delaying the time by which a complete cardiac replacement may become unavoidable.

5. Conclusions

In this study we epicardially delivered nanofibrous collagen scaffolds seeded with cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPS-CM) in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *In vivo* and *in vitro* assays indicated the optimal electrospinning and crosslinking conditions to produce biocompatible scaffolds with stiffness comparable to those reported for optimizing cardiac tissue regeneration. *In vivo* results have shown a restricted thickening of the matrix extending into the scaffold and an increase, although not significant, in the expression of several genes implicated in the regulation of extracellular matrix. These results support that a hiPS-CM-loaded electrospun collagen scaffold could be utilized for the stabilization of DCM, most likely through paracrine signaling. Therefore, iPS-CM seem to potentiate the effects of collagen scaffolds and, in a broader perspective, the current results support the concept that cardiac engineering could be a therapeutically effective strategy in patients with advanced but non end-stage dilated cardiomyopathy.

Funding

This work was supported by funds from CNRS, INSERM, University Pierre&Marie Curie, University Paris Descartes and the ANR-12-RPIB-0015, the Fondation de l'Avenir (ET2-658 & AP-RMA-2015-036) and the LabEx REVIVE (ANR-10-LABX-73). P.J. and S.E.B. were supported by a fellowship from the Fondation Lefoulon-Delalande and the Conseil Régional d'Île de France (DIM Biothérapies), respectively.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

Authors thank Dr. Z. Li, Dr. M. Mericskay, Dr. A. Parlakian (UMR CNRS 8256, Paris, France) for scientific discussion and for providing

them with a breeding pair of α MHC-MerCreMer:Sf/Sf mice, A. Munier for technical assistance during flow cytometry analysis and B. Poinard for technical help during neonatal rat cardiomyocytes preparation and I. Ben Dhiab for technical help in the scaffolds preparation.

Authors thank also the Microscopy Platform (IBPS, Paris-France) for helpful advice and technical assistance during microscopy image acquisition and analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.035>.

References

- [1] R.E. Hershberger, A. Morales, J.D. Siegfried, Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals, *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 12 (2010) 655–667.
- [2] A. Clarke, R. Pulikottil-Jacob, M. Connock, G. Suri, N.-B. Kandala, H. Maheswaran, N.R. Banner, P. Sutcliffe, Cost-effectiveness of left ventricular assist devices (LVADs) for patients with advanced heart failure: analysis of the British NHS bridge to transplant (BTT) program, *Int. J. Cardiol.* 171 (2014) 338–345.
- [3] C.B. Patel, J.A. Cowger, A. Zuckermann, A contemporary review of mechanical circulatory support, *J. Heart Lung Transpl. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transpl.* 33 (2014) 667–674.
- [4] A. Ale, F. Siebenhaar, K. Kosanke, M. Aichler, K. Radrich, S. Heydrich, M. Schiemann, I. Bielicki, P.B. Noel, R. Braren, M. Maurer, A.K. Walch, E.J. Rummeny, V. Ntziachristos, M. Wildgruber, Cardioprotective C-kit⁺ bone marrow cells attenuate apoptosis after acute myocardial infarction in mice – in-vivo assessment with fluorescence molecular imaging, *Theranostics* 3 (2013) 903–913.
- [5] M.A. Thal, P. Krishnamurthy, A.R. Mackie, E. Hoxha, E. Lambers, S. Verma, V. Ramirez, G. Qin, D.W. Losordo, R. Kishore, Enhanced angiogenic and cardiomyocyte differentiation capacity of epigenetically reprogrammed mouse and human endothelial progenitor cells augments their efficacy for ischemic myocardial repair, *Circ. Res.* 111 (2012) 180–190.
- [6] C. Valina, K. Pinkernell, Y.-H. Song, X. Bai, S. Sadat, R.J. Campeau, Jemtel TH. Le, E. Alt, Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction, *Eur. Heart J.* 28 (2007) 2667–2677.
- [7] G. Poglajen, B. Vrtovec, Stem cell therapy for chronic heart failure, *Curr. Opin. Cardiol.* 30 (2015) 301–310.
- [8] J.J.H. Chong, X. Yang, C.W. Don, E. Minami, Y.-W. Liu, J.J. Weyers, W.M. Mahoney, Biber B. Van, S.M. Cook, N.J. Palpant, J.A. Gantz, J.A. Fugate, V. Muskheli, G.M. Gough, K.W. Vogel, C.A. Astley, C.E. Hotchkiss, A. Baldessari, L. Pabon, H. Reinecke, E.A. Gill, V. Nelson, H.-P. Kiem, M.A. Laflamme, C.E. Murry, Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts, *Nature* 510 (2014) 273–277.
- [9] V. Bellamy, V. Vanneaux, A. Bel, H. Nemetalla, S.E. Boitard, Y. Farouz, P. Joanne, M.-C. Perier, E. Robidel, C. Mandet, A. Hagege, P. Bruneval, J. Larghero, O. Agbulut, P. Menasché, Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold, *J. Heart Lung Transpl. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transpl.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2014.10.008> pii: S1053–2498(14)01432-6.
- [10] O. Agbulut, M.-L. Menot, Z. Li, F. Marotte, D. Paulin, A.A. Hagege, C. Chomienne, J.-L. Samuel, P. Menasché, Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy, *Cardiovasc. Res.* 58 (2003) 451–459.
- [11] J. Pouly, A.A. Hagege, J.-T. Vilquin, A. Bissery, A. Rouche, P. Bruneval, D. Duboc, M. Desnos, M. Fiszman, Y. Fromes, P. Menasché, Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation* 110 (2004) 1626–1631.
- [12] H. Hamdi, S. Boitard, V. Planat-Benard, J. Pouly, H. Neamatalla, P. Joanne, M.-C. Perier, V. Bellamy, L. Casteilla, Z. Li, A. Hagege, M. Mericskay, P. Menasché, O. Agbulut, Efficacy of epicardially-delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy, *Cardiovasc. Res.* 99 (2013) 640–647.
- [13] K.A. Gerbin, C.E. Murry, The winding road to regenerating the human heart, *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 24 (2015) 133–140.
- [14] X. Lian, J. Zhang, S.M. Azarin, K. Zhu, L.B. Hazeltine, X. Bao, C. Hsiao, T.J. Kamp, S.P. Palecek, Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 162–175.
- [15] H. Hamdi, A. Furuta, V. Bellamy, A. Bel, E. Puymirat, S. Peyrard, O. Agbulut, P. Menasché, Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison, *Ann. Thorac. Surg.* 87 (2009) 1196–1203.
- [16] H. Hamdi, V. Planat-Benard, A. Bel, E. Puymirat, R. Geha, L. Pidal, H. Nematalla, V. Bellamy, P. Bouaziz, S. Peyrard, L. Casteilla, P. Bruneval, A.A. Hagege, O. Agbulut, P. Menasché, Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections, *Cardiovasc. Res.* 91 (2011) 483–491.
- [17] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix elasticity directs stem cell lineage specification, *Cell* 126 (2006) 677–689.
- [18] J.G. Jacot, A.D. McCulloch, J.H. Omens, Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes, *Biophys. J.* 95 (2008) 3479–3487.
- [19] Z. Kassiri, R. Khokha, Myocardial extra-cellular matrix and its regulation by metalloproteinases and their inhibitors, *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 212–219.
- [20] V. Pelouch, I.M. Dixon, L. Golfman, R.E. Beamish, N.S. Dhalla, Role of extracellular matrix proteins in heart function, *Mol. Cell. Biochem.* 129 (1993) 101–120.
- [21] S.A. Sell, M.J. McClure, K. Garg, P.S. Wolfe, G.L. Bowlin, Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1007–1019.
- [22] Travis J. Sill, Horst A. von Recum, Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 29 (2008) 1989–2006.
- [23] S. Mukherjee, J.R. Venugopal, R. Ravichandran, M. Ramalingam, M. Raghunath, S. Ramakrishna, Nanofiber technology for controlling stem cell functions and tissue engineering, in: M. Ramalingam, E. Jabbari, S. Ramakrishna, A. Khademhosseini (Eds.), *Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013, <http://dx.doi.org/10.1002/9781118574775.ch2>.
- [24] Zi Yin, Xiao Chen, Hai-Xin Song, Jia-Jie Hu, Qiao-Mei Tang, Ting Zhu, Wei-Liang Shen, Jia-Lin Chen, Huanhuan Liu, Boon Chin Heng, Hong-Wei Ouyang, Electrospun scaffolds for multiple tissues regeneration in vivo through topography dependent induction of lineage specific differentiation, *Biomaterials* 44 (2015) 173–185.
- [25] M. Kitsara, P. Joanne, S.E. Boitard, I. Ben Dhiab, B. Poinard, P. Menasché, C. Gagnieu, P. Forest, O. Agbulut, Y. Chen, Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers, *Microelectron. Eng.* 144 (2015) 46–50.
- [26] B. Dong, O. Arnould, M.E. Smith, G.E. Wnek, Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents, *Macromol. Rapid Commun.* 30 (2009) 539–542.
- [27] Q. Jiang, N. Reddy, S. Zhang, N. Roscioli, Y. Yang, Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101 (2013) 1237–1247.
- [28] M. Pernot, M. Couade, P. Mateo, B. Crozatier, R. Fischmeister, M. Tanter, Real-time assessment of myocardial contractility using shear wave imaging, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 65–72.
- [29] M. Couade, M. Pernot, C. Prada, E. Messas, J. Emmerich, P. Bruneval, A. Criton, M. Fink, M. Tanter, Quantitative assessment of arterial wall biomechanical properties using shear wave imaging, *Ultrasound Med. Biol.* 36 (2010) 1662–1676.
- [30] P.W. Burridge, E. Matsa, P. Shukla, Z.C. Lin, J.M. Churko, A.D. Ebert, F. Lan, S. Diecke, B. Huber, N.M. Mordwinkin, J.R. Plews, O.J. Abilez, B. Cui, J.D. Gold, J.C. Wu, Chemically defined generation of human cardiomyocytes, *Nat. Methods* 11 (2014) 855–860.
- [31] A. Parlakian, C. Charvet, B. Escoubet, M. Mericskay, J.D. Molkenkin, G. Gary-Bobo, Windt Lj. De, M.-A. Ludosky, D. Paulin, D. Daegelen, D. Tuil, Z. Li, Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart, *Circulation* 112 (2005) 2930–2939.
- [32] M.J. Koren, R.B. Devereux, P.N. Casale, D.D. Savage, J.H. Laragh, Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension, *Ann. Intern. Med.* 114 (1991) 345–352.
- [33] L.H. Lund, L.B. Edwards, A.Y. Kucheryavaya, C. Bendin, J.D. Christie, A.I. Dipchand, F. Dobbels, S.B. Goldfarb, B.J. Levvey, B. Meiser, R.D. Yusen, J. Stehlik, International society of heart and lung transplantation. The registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-first official adult heart transplant report-2014; focus theme: retransplantation, *J. Heart Lung Transpl. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transpl.* 33 (2014) 996–1008.
- [34] J.C. Garber, R.T. Lee, Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration, *Cell Stem Cell* 12 (2013) 689–698.
- [35] P.V. Kochupura, E.U. Azeloglu, D.J. Kelly, S.V. Doronin, S.F. Badyaluk, I.B. Krukenkamp, I.S. Cohen, G.R. Gaudette, Tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix provides regional mechanical function, *Circulation* 112 (2005) 1144–1149.
- [36] S.D. Zimmerman, W.J. Karlon, J.W. Holmes, J.H. Omens, J.W. Covell, Structural and mechanical factors influencing infarct scar collagen organization, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (2000) H194–H200.
- [37] G. Macchiarelli, O. Ohtani, S.A. Nottola, T. Stallone, A. Camboni, I.M. Prado, P.M. Motta, A micro-anatomical model of the distribution of myocardial endomyocardial collagen, *Histol. Histopathol.* 17 (2002) 699–706.
- [38] A.J. Engler, C. Carag-Krieger, C.P. Johnson, M. Raab, H.-Y. Tang, D.W. Speicher, J.W. Sanger, J.M. Sanger, D.E. Discher, Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 3794–3802.
- [39] M.F. Berry, A.J. Engler, Y.J. Woo, T.J. Pirolli, L.T. Bish, V. Jayasankar, K.J. Morine, T.J. Gardner, D.E. Discher, H.L. Sweeney, Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (2006) H2196–H2203.
- [40] R.R. Chaturvedi, T. Herron, R. Simmons, D. Shore, P. Kumar, B. Sethia, F. Chua, E. Vassiliadis, J.C. Kentish, Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole, *Circulation* 121 (2010) 979–988.

- [41] A. Rossini, C. Frati, C. Lagrasta, G. Graiani, A. Scopece, S. Cavalli, E. Musso, M. Baccarin, M. Di Segni, F. Fagnoni, A. Germani, E. Quaini, M. Mayr, Q. Xu, A. Barbuti, D. DiFrancesco, G. Pompilio, F. Quaini, C. Gaetano, M.C. Capogrossi, Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin, *Cardiovasc. Res.* 89 (2011) 650–660.
- [42] B.N. Oskouei, G. Lamirault, C. Joseph, A.V. Treuer, S. Landa, Silva J. Da, K. Hatzistergos, M. Dauer, W. Balkan, I. McNiece, J.M. Hare, Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair, *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012) 116–124.
- [43] T.-S. Li, K. Cheng, K. Malliaras, R.R. Smith, Y. Zhang, B. Sun, N. Matsushita, A. Blusztajn, J. Terrovitis, H. Kusuoka, L. Marbán, E. Marbán, 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 (2012) 942–953.
- [44] S.-X. Zheng, Y.-L. Weng, C.-Q. Zhou, Z.-Z. Wen, H. Huang, W. Wu, J.-F. Wang, T. Wang, Comparison of cardiac stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on the cardiac electrophysiology in rats with myocardial infarction, *Stem Cell Rev.* 9 (2013) 339–349.
- [45] L. Citro, S. Naidu, F. Hassan, M.L. Kuppusamy, P. Kuppusamy, M.G. Angelos, M. Khan, Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction, *PLoS ONE* 9 (2014) e116281.
- [46] S. Fernandes, A.V. Naumova, W.Z. Zhu, M.A. Laflamme, J. Gold, C.E. Murry, Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49 (2010) 941–949.
- [47] L. Tian, S.A. Hires, T. Mao, D. Huber, M.E. Chiappe, S.H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S.A. McKinney, E.R. Schreier, C.I. Bargmann, V. Jayaraman, K. Svoboda, L.L. Looger, Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nat. Methods* 6 (2009) 875–881.
- [48] T. Higuchi, S. Miyagawa, J.T. Pearson, S. Fukushima, A. Saito, H. Tsuchimochi, T. Sonobe, Y. Fujii, N. Yagi, A. Astolfo, M. Shirai, Y. Sawa, Functional and electrical integration of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a myocardial infarction rat heart, *Cell Transpl.* (2015). PMID: 25606821.
- [49] N. Diguët, Y. Mallat, R. Ladouce, G. Clodic, A. Prola, E. Tritsch, J. Blanc, J.-C. Larcher, C. Delcayre, J.-L. Samuel, B. Friguet, G. Bolbach, Z. Li, M. Mericskay, Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35007–35019.
- [50] C.A. Franco, J. Blanc, A. Parlakian, R. Blanco, I.M. Aspalter, N. Kazakova, N. Diguët, E. Mylonas, J. Gao-Li, A. Vaahtokari, V. Penard-Lacronique, M. Fruttiger, I. Rosewell, M. Mericskay, H. Gerhardt, Z. Li, SRF selectively controls tip cell invasive behavior in angiogenesis, *Dev. Camb. Engl.* 140 (2013) 2321–2333.
- [51] T. Twardowski, A. Fertala, J.P.R.O. Orgel, J.D. San Antonio, Type I collagen and collagen mimetics as angiogenesis promoting superpolymers, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 3608–3621.
- [52] P. Krishnamurthy, J.T. Peterson, V. Subramanian, M. Singh, K. Singh, Inhibition of matrix metalloproteinases improves left ventricular function in mice lacking osteopontin after myocardial infarction, *Mol. Cell. Biochem.* 322 (2009) 53–62.
- [53] R. Al-Daccak, D. Charron, Allogenic benefit in stem cell therapy: cardiac repair and regeneration, *Tissue Antigens* 86 (2015) 155–162.
- [54] J. Ye, M. Gaur, Y. Zhang, R.E. Sievers, B.J. Woods, J. Aurigui, H.S. Bernstein, Y. Yeghiazarians, Treatment with hESC-derived myocardial precursors improves cardiac function after a myocardial infarction, *PLoS ONE* 10 (2015) e0131123.
- [55] E. Kolossov, T. Bostani, W. Roell, M. Breitbach, F. Pillekamp, J.M. Nygren, P. Sasse, O. Rubenchik, J.W.U. Fries, D. Wenzel, C. Geisen, Y. Xia, Z. Lu, Y. Duan, R. Kettenhofen, S. Jovinge, W. Bloch, H. Bohlen, A. Welz, J. Hescheler, S.E. Jacobsen, B.K. Fleischmann, Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2315–2327.

Annexe 5

Chitosan Hydrogels for the Regeneration of Infarcted Myocardium: Preparation, Physicochemical Characterization, and Biological Evaluation

Anderson Fiamingo,^{†,‡} Alexandra Montembault,[†] Solène-Emmanuelle Boitard,[§] Hany Naemetalla,^{⊥,¶} Onnik Agbulut,[§] Thierry Delair,[†] Sérgio Paulo Campana-Filho,[‡] Philippe Menasché,^{⊥,#} and Laurent David^{*,†}

[†]Ingénierie des Matériaux Polymères IMP@Lyon1, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, UMR CNRS 5223, 15 bd Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex, France

[‡]Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São-carlense, 400 São Carlos, Brazil

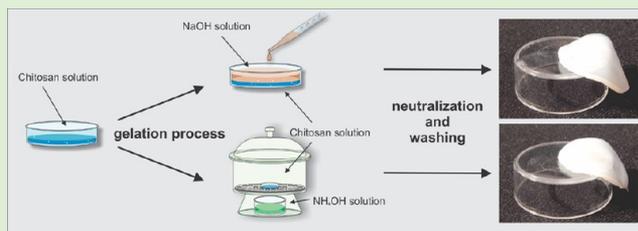
[§]UMR CNRS 8256, Biological Adaptation and Ageing, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), 75005 Paris, France

[⊥]INSERM UMR 970, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

[¶]Department of Cardiology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

[#]Department of Cardiovascular Surgery, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, 75015 Paris, France

ABSTRACT: The formation of chitosan hydrogels without any external cross-linking agent was successfully achieved by inducing the gelation of a viscous chitosan solution with aqueous NaOH or gaseous NH₃. The hydrogels produced from high molecular weight ($M_w \approx 640\,000\text{ g mol}^{-1}$) and extensively deacetylated chitosan ($DA \approx 2.8\%$) at polymer concentrations above $\sim 2.0\%$ exhibited improved mechanical properties due to the increase of the chain entanglements and intermolecular junctions. The results also show that the physicochemical and mechanical properties of chitosan hydrogels can be controlled by varying their polymer concentration and by controlling the gelation conditions, that is, by using different gelation routes. The biological evaluation of such hydrogels for regeneration of infarcted myocardium revealed that chitosan hydrogels prepared from 1.5% polymer solutions were perfectly incorporated onto the epicardial surface of the heart and presented partial degradation accompanied by mononuclear cell infiltration.



INTRODUCTION

Myocardial infarction is an injury usually caused by obstruction of a major coronary artery. It leads to irreversible cell loss, scar formation, and eventually heart failure. Many methods and materials have been tested in an effort to stimulate myocardial regeneration and increase cardiac performance^{1–5} including the design of regenerative patches^{1–5,5} to be implanted onto the surface of the infarcted myocardium. Such design requires the use of biomaterials with the suitable biological properties including colonization ability and regenerative properties, which can be obtained with natural polymers such as proteins (e.g., collagen) or polysaccharides.

Among polysaccharides, glycosaminoglycans, especially chitosan, constitute a promising polymer family exhibiting many key properties for the biomedical area such as bioresorbability,⁶ biocompatibility,⁷ low immunogenicity, antimicrobial activity,⁸ antioxidant activity,⁹ hemostatic effects,¹⁰ and wound-healing acceleration.^{11,12}

Chitosan is usually produced from the *N*-deacetylation of chitin,^{13–15} an abundant polysaccharide present in the cuticles of arthropods, the exoskeletons of cephalopods, and cell wall of fungi.¹³ Chitosan and chitin belong to the family of the linear copolymers of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcN) and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcNAc) units linked by β -(1–4)-glycosidic bonds. The main properties and applications of chitosan depend on its average degree of acetylation (*DA*), that is, the molar fraction of GlcNAc units, its acetylation pattern, which corresponds to the distribution of GlcN and GlcNAc units along the chitosan chains, its average molecular weight, and polydispersity index.

Hydrogels based on chitosan have been widely studied for their interesting biological properties. The physical and

Received: January 18, 2016

Revised: April 3, 2016

Published: April 11, 2016

chemical gelation of chitosan is widely reported in the literature.^{16–20} Temperature-responsive and photo-cross-linkable chitosan-based hydrogels have shown the ability of controlled release of stem cells²¹ and various growth factors^{22–24} serving as novel carriers and inducing vascularization *in vivo*.

The first true chitosan-based physical hydrogels prepared without using any cross-linking agent were described by Hirano, Kondo, and Ohe⁷ during the homogeneous acylation of chitosan with various anhydrides in hydro-alcoholic medium. Then Moore and Roberts²⁵ also studied the gelation of chitosan by treating it with anhydrides and proposed that the gelation process was due to the progressive decrease of the polymer solubility as a consequence of decreasing polymer charge density provoked by *N*-acylation. Montembault, Viton, and Domard¹⁸ proposed that chitosan physical hydrogels resulted from extensive hydrogen bonding and hydrophobic interactions when a critical balance between hydrophilic/hydrophobic interactions was reached, depending on various external parameters such as *DA* and the apparent charge density of chitosan, the dielectric constant of the solvent, viscosity of the medium, and temperature. Then Montembault et al.²⁶ and Ladet et al.²⁷ described the use of chitosan physical hydrogels in the regeneration of cartilage tissue *in vitro*. Such chitosan hydrogels were prepared upon contact of gaseous ammonia or NaOH aqueous solution with the polymer solution, and washed gel fragments were mixed with rabbit (or human) chondrocytes.²⁸ In a different strategy,²⁷ multimembrane hydrogels were used to host and amplify chondrocytes. In both approaches, it was observed that the physical chitosan materials were noncytotoxic. The phenotype of chondrocytes was preserved for as long as 45 days and the cells were surrounded by a functional cartilage-type protein matrix.

In the present study, it is reported the use of chitosan possessing high average molecular weight and low *DA* to prepare physical chitosan hydrogels by applying two different gelation processes, namely gaseous NH₃ induced-gelation process and NaOH induced-gelation process, aiming to design a novel biomaterial potentially useful for the regeneration of infarcted myocardium.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chitosan. Chitosan resulting from the deacetylation of beta-chitin extracted from squid pens was acquired from Mahtani Chitosan (batch number 114, 26/09/12). Before use, the polymer was dissolved at 0.5% (w/w) in aqueous acetic acid to result in the stoichiometric protonation of the amine groups pertaining to GlcN units, and the resulting solution was filtered successively on 1.2, 0.8, and 0.45 μm Millipore membranes. Ammonia hydroxide solution was then added to the polymer solution to induce precipitation of chitosan, which was thoroughly washed with deionized water and freeze-dried.

The average *DA* of chitosan was determined according to Hirai et al.²⁸ from its ¹H NMR spectrum. Thus, the polymer (8 mg) was dissolved in D₂O/HCl (1 g/5 μL), and the spectrum was acquired at 25 ± 1 °C by using a Bruker spectrometer (ν = 250 MHz). Size exclusion chromatography was used to determine the weight-average molecular weight (*M_w*) and dispersity (*Đ*) of chitosan. The polymer was dissolved in 0.15 mol L⁻¹ ammonium acetate/0.20 mol L⁻¹ acetic acid buffer (pH 4.5); the solution was then filtered through 0.45 μm Millipore membrane and injected (ν = 100 μL), eluted at a flow rate 0.5 mL min⁻¹ (1260 Infinity Quaternary pump, Agilent Technologies), through TSK 2500 and TSK 6000 columns coupled to a differential refractometer detector (Optilab T-rEX, Wyatt; λ = 658 nm) and multiangle laser light scattering detector (Dawn-EOS, Wyatt; λ 690 nm).

To determine its water content, chitosan (10 mg) was analyzed by using a thermogravimetric analyzer (TGA Q500, TA Instruments) operating at a ramp of temperature of 2 °C min⁻¹, from 25–150 °C, under helium atmosphere.

Thus, the chitosan used in this work is characterized by a low *DA* (2.8%), a high average molecular weight (*M_w* = 640 000 g mol⁻¹), a low polydispersity index (*Đ* = 1.34), and a water content of 10 ± 1% (w/w).

Preparation, Sterilization, and Storage of Chitosan Hydrogels. Chitosan physical hydrogels were formed by adopting two different gelation processes, namely aqueous NaOH induced-gelation and gaseous NH₃ induced-gelation. For doing so, chitosan was dissolved in diluted aqueous acetic acid in stoichiometric protonation conditions. The resulting chitosan solutions (*C_p* = 1.0, 1.5, 2.0, 3.5, and 5.0%) were centrifuged to remove air bubbles and then poured into Petri dishes with a diameter of 3.5 cm. Chitosan hydrogels were obtained by contacting the polymer solution with concentrated aqueous NaOH (3.0 mol L⁻¹) for 1 h. For inducing gelation with the gaseous NH₃, the chitosan solution was placed for 24 h in a glass reactor containing 100 mL of aqueous NH₄OH (2.0 mol L⁻¹). Regardless of the gelation process, the chitosan hydrogels were thoroughly washed with deionized water until neutrality and complete elimination of ammonium hydroxide and acetate salts, and then they were stored in deionized water.

Before implantation into animals, chitosan hydrogels were sterilized by high-temperature steam sterilization, considered as one of the safest and most convenient means to sterilize medical devices including chitosan physical hydrogels.^{29,30} Thus, the sterilization of chitosan hydrogels contained in a Schott bottle was carried out in standard conditions, at 121 °C for 15 min, by using an autoclave (K₇₊, Getinge).

To identify the chitosan hydrogels the codification “Ch-X-Y-St” is used, where “X” stands for the chitosan concentration in the solution used to prepare the hydrogels (i.e., *C_p* = 1.0, 1.5, 2.0, 3.5, or 5.0%), “Y” describes the gelation process (S for NaOH and N for gaseous NH₃ induced-gelation), while “St” identifies sterilized hydrogels.

After sterilization, the hydrogels were stored in deionized water at room temperature for up to 210 days in low-light environment and the weight-average molecular weight of chitosan was monitored as a function of storage time by using size exclusion chromatography (SEC). For doing so, each 30 days a small sample of the sterilized chitosan hydrogel was cut, freeze-dried, dissolved in 0.15 mol L⁻¹ ammonium acetate/0.20 mol L⁻¹ acetic acid buffer (pH 4.5), filtered on 0.45 μm Millipore membrane, and then submitted to SEC analysis.

The final polymer concentration within the chitosan hydrogels was determined as described in the literature.¹⁷ Thus, a known weight of chitosan hydrogel was freeze-dried and then submitted to thermogravimetric analysis, the weight of polymer within the hydrogel being precisely determined by knowing the hydrogel initial weight and water content.

Rheometry Analyses. Dynamic-mechanical rheological measurements were carried out at room temperature by using an ARES rheometer (TA Instruments) operating with a plate–plate geometry (diameter 5 mm). The strain amplitude was monitored to ensure the measurements were carried out within the linear viscoelastic region (maximum applied strain = 5 × 10⁻³), resulting in storage modulus (*G'*) and loss modulus (*G''*) independent of the strain amplitude. The gap varied around 1.0 mm, and it was deduced by using the rheometer normal force sensor to measure the upper plate location at the first contact with the hydrogel disk membrane. Angular frequency sweep measurements were then carried out in the range from 100 rad s⁻¹ down to 0.05 rad s⁻¹. Such analyses were repeated three times for each hydrogel.

Tensile Tests. The tensile tests were carried out at room temperature in a dynamic mechanical analyzer (DMA Q800, TA Instruments) by using a gripper-type Tension film, the length between the grips being 12 mm. The chitosan hydrogels were cut in rectangular strips (30 mm × 5.7 mm × 1 mm), and the measurements were carried out by adopting ramp displacement of 2.0 mm min⁻¹ up to 25.0 mm and a preloading strength of 0.01 N. Such tests allowed the determination of ultimate tensile strength (MPa), elastic modulus

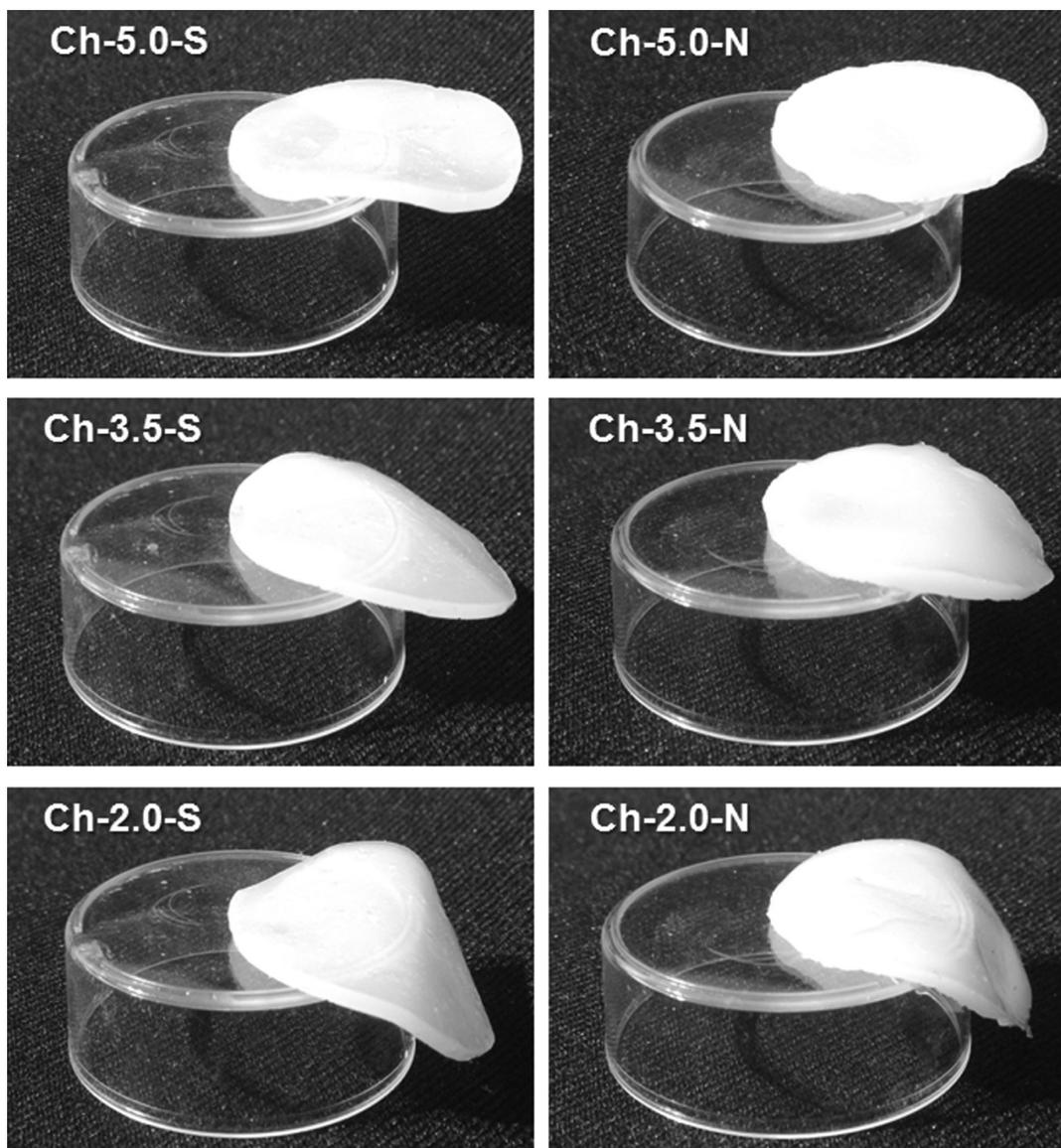


Figure 1. Chitosan hydrogels obtained from different polymer solution concentrations (5.0, 3.5, and 2.0% (w/w)) and by adopting two different gelation routes (“S” for NaOH solution and “N” for NH₃ gaseous).

(kPa), and elongation-at-break (%). Such analyses were repeated five times for each hydrogel.

Suturability Tests. The suturability of the chitosan hydrogels was evaluated by a resistance test in the tear of the suture thread. The method consists of making a loose suture in the hydrogel and gradually increasing the applied force to the suture until the occurrence of break.

Samples of 10 mm × 10 mm with various thicknesses were analyzed in a dynamic mechanical analyzer (DMA Q800, TA Instruments) by using a tension gripper. The hydrogel was punctured at 3 mm of its down edge with a suture thread (Polypropylene thread, Prolene 6/0; Ethicon), fixed to the upper clamp of the DMA, and the loop of the suture thread was fixed to the lower clamp. The tensile suture measurements were carried out at room temperature in force controlled mode with ramp strength of 0.5 N min⁻¹ up to 18.0 N and a preloading strength of 0.01 N, allowing the determination of ultimate suture load. Such analyses were repeated five times for each hydrogel.

Animal Studies. Forty female Wistar rats (Janvier Laboratories, Genest Saint Isle, France) weighing 200–250 g were used in this study. All procedures were approved by our institutional ethics committee and complied with the European legislation on animal care (European Commission Directive 86/609/EEC). Rats were anaes-

thetized for the creation of myocardial infarction with isoflurane (Baxter, Maurepas, France), 3% at induction and 1.5% for maintenance, and tracheally ventilated at a rate of 70 min⁻¹ and with a 0.2 mL average insufflate volume (Alphalab, Minerve, France). Analgesia was performed for 2 days after surgery with a 10 mg kg⁻¹ peritoneal injection of ketoprofen (Merial, Lyon, France). The heart was exposed through a left thoracotomy, and the left coronary artery was permanently ligated between the pulmonary artery trunk and the left atrial appendage. Three weeks after myocardial infarction, rats underwent a baseline echocardiographic assessment of left ventricular (LV) function. Following a median sternotomy, animals were then randomly allocated to receive an epicardial delivery of 1.5% chitosan hydrogels ($n = 12$) or 2% chitosan hydrogels ($n = 12$) overlaying the infarcted area. In parallel, untreated rats were used as control ($n = 8$). The mortality rate due to surgical procedures was about 20% in all groups.

Assessment of Left Ventricular Function. Pre- and post-transplantation cardiac function was evaluated by transthoracic echocardiography (Sequoia 516, equipped with a 13-MHz phased array linear 15L8 probe; Siemens, Saint-Denis, France) in animals sedated with 2% isoflurane (Sigma-Aldrich). Parasternal two-dimensional long-axis views allowed measurement of LV end-diastolic

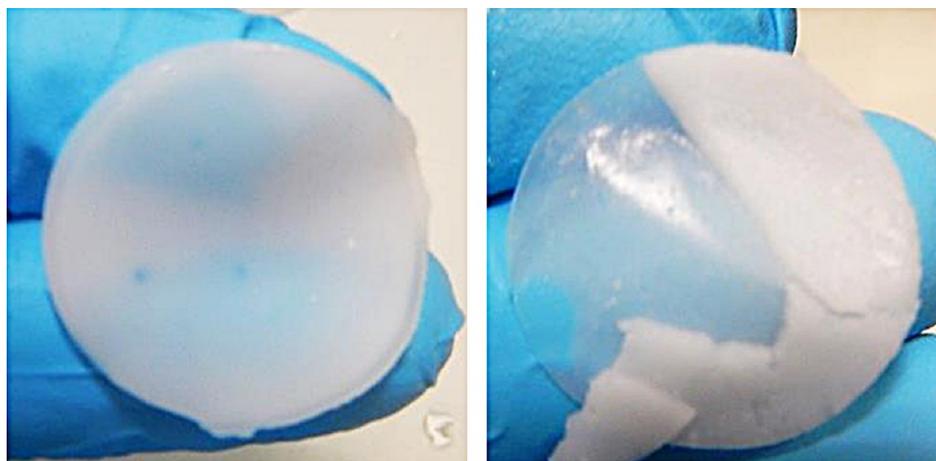


Figure 2. Bilayered macroscopic structure of the Ch-3.5-N hydrogels with an initial polymer solution concentration of 3.5% (w/w) and gelled by NH_3 vapors.

volume (LVEDV) and LV end-systolic volume (LVESV) as described by Agbulut et al.³¹ LV ejection fraction (LVEF, %) was calculated as $[(\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / (100 \times \text{LVEDV})]$. All measurements were performed on digital loops in triplicate and averaged by an investigator blinded to the treatment group.

Histological Assessment. After the last echocardiographic assessment and sacrifice, hearts were removed and separated in two halves by a short-axis section through the midportion of the infarcted area. The blocks were immediately fixed in 4% of formaldehyde for 24 h, dehydrated, and embedded in paraffin. Serial heart sections were made, stained with hematoxylin and eosin, and examined by light microscopy.

RESULTS AND DISCUSSION

The formation of hydrogels by the neutralization of protonated chitosan in aqueous acidic solution is a complex physical chemical process involving a variety of molecular interactions and leading to gels with complex structure. In acidic solution at $\text{pH} = 4\text{--}5$ below the pK_a of amine moieties, the chitosan chains are protonated. Such charged chitosan chains exhibit high entanglement density and persistence length resulting from the intrinsic persistence length characterizing the local stiffness of neutralized chains and the electrostatic persistence length related to the electrostatic repulsions between adjacent ionic sites.³² However, to favor the formation of chitosan physical hydrogels,¹⁷ the charge density of the chitosan chains must be decreased to promote hydrophobic interactions and hydrogen bonding but without reaching complete chain disentanglement and chain collapse.

During the gelation, it was visually observed a gradual displacement of the interface between solution and gel from the surface to the bottom of the Petri dishes. After washing, it could be also observed that the hydrogels seemed to be softer or harder materials according to the chitosan concentration and gelation process (Figure 1).

Indeed, the hydrogels prepared from 0.5% (w/w) chitosan solutions, regardless of the gelation process, were extremely fragile, spontaneously breaking into fragments during washing and handling. In contrast, the use of 10.0% (w/w) chitosan solutions resulted in inhomogeneous hydrogels as it was difficult to spread the chitosan solution in the Petri dishes owing to the high solution viscosity at such a high polymer concentration.

Hydrogels processed at polymer concentration in the range from 1.0–5.0% (w/w) were more homogeneous. However, the

Ch-N hydrogels were constituted by two adherent hydrogel layers, a resistant layer (thickness of 0.10–0.15 mm) was formed at the initial surface of the solution, while an internal layer was constituted by a whiter and softer hydrogel, which was brittle at the lowest polymer concentrations (Figure 2).

The two-layered structure was only obtained via the ammonia neutralization route, the external layer probably resulting from the fast neutralization of the surface of the chitosan solution upon condensation of gaseous ammonia. The internal gel was formed after slower diffusion of ammonia through the first formed membrane, with a kinetics allowing partial chain disentanglement of the solution and yielding softer hydrogels. Such interplay between the dynamics of chain disentanglements and the dynamics of gel formation explains the structuration of multimembrane hydrogels³³ and was also invoked recently to describe the spontaneous multilayered structure of chitosan hydrogels.³⁴

In this work, the two-layered structures were easily separated in the case of Ch-N hydrogels prepared from the low polymer concentration solution, but the layered association remained sufficiently entangled in the Ch-5.0-N and Ch-10.0-N hydrogels so that it was no longer possible to separate it manually without breaking the internal gel.

Steam sterilization did not induce significant changes of shape or color of hydrogels. Nevertheless, on storing at ambient temperature in deionized water, the internal structure of the Ch-1.0-N-St and Ch-1.5-N-St hydrogels started to fracture, and complete separation of the layers was observed after 3–4 weeks, the surface layer remaining intact and the internal gel being partly fragmented. The structural and mechanical stability of virgin and sterilized gels was not better in PBS than in deionized water. These results are probably due to the formation of complex between phosphate ions and chitosan chains; such complexes would promote the rupture of interchain interactions and a drift in the mechanical properties of the hydrogels.

Storage Test. From the normalized SEC elution diagrams (Figure 3), it is possible to observe the changes of molecular mass distributions and the corresponding evolution of the weight-average molecular weight as a function of storage time can be evaluated (Figure 4). As shown in Figure 3, the parent chitosan presents a monomodal and symmetrical distribution, the quantitative treatment of such SEC curve resulting in high

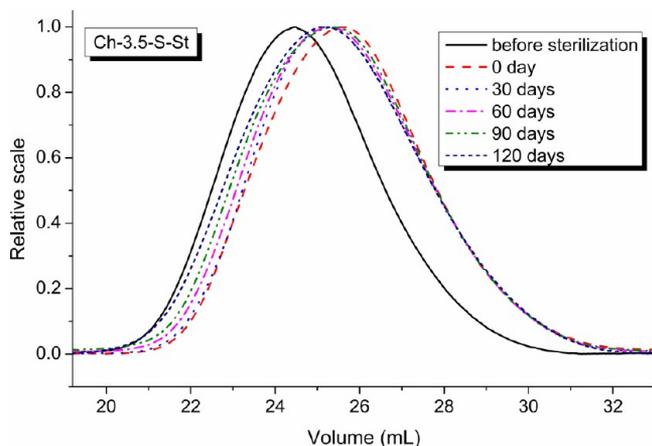


Figure 3. Evolution of normalized SEC elution diagrams as a function of storage time in deionized water for sterilized hydrogels (Ch-3.5-S-St).

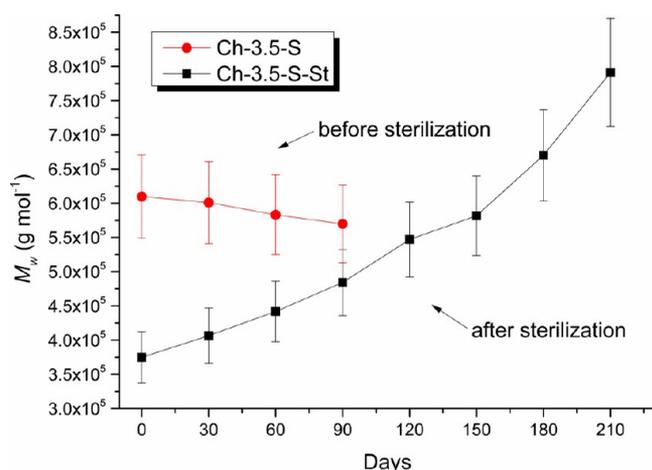


Figure 4. Evolution of the weight-average molecular weight (M_w) as a function of storage time in deionized water for sterilized hydrogels (Ch-3.5-S-St).

weight-average molecular weight ($M_w = 640\,000\text{ g mol}^{-1}$) and low dispersity index ($\mathcal{D} = 1.34$). After the gelation process, the resulting chitosan hydrogel (Ch-3.5-S-St) exhibited a slightly lower weight-average molecular weight ($M_w = 610\,000\text{ g mol}^{-1}$) and similar dispersity index ($\mathcal{D} = 1.49$). However, a significant decrease of weight-average molecular weight ($M_w = 375\,000\text{ g mol}^{-1}$) and a small increase of polydispersity index ($\mathcal{D} = 1.83$) were observed after sterilization (Figure 4).

In contrast, a significant increase in M_w during the storage of sterilized hydrogels is clearly evidenced in contrast with nonsterilized hydrogels (Figure 4). Such a specific behavior of sterilized chitosan hydrogel during storage could be explained assuming the formation of reactive intermediates during sterilization, allowing the slow cross-linking of the polymer chains. Thus, this could be related to various alterations of chitosan chains such as oxidation of primary alcohols to aldehyde groups, free radical generation, and double bond formation with slow subsequent reaction with oxygen.

Thickness and Final Concentration Test. During the washing step, hydrogels can possibly swell or exclude the solvent entrapped in the polymer network, which can lead to significant changes in polymer concentration, gel thickness, and properties. Therefore, to monitor the occurrence of swelling or

shrinkage upon washing, the thicknesses at the center of the hydrogels were measured and related to the weight of the chitosan solution added to the Petri dish (Figure 5).

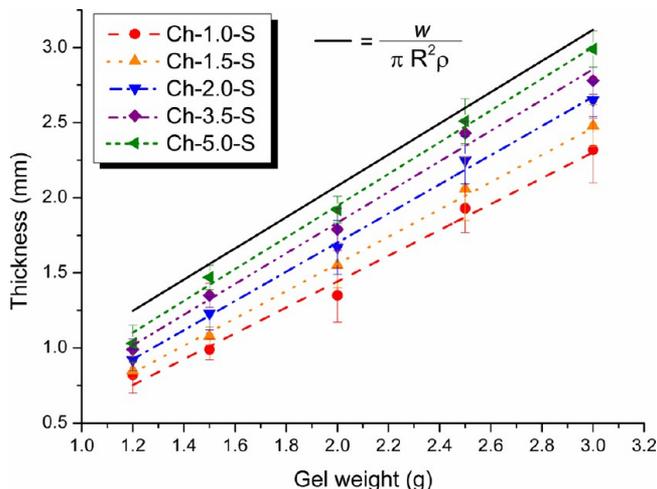


Figure 5. Thickness at the center of the hydrogels versus weight of the chitosan solution added to the Petri dish (diameter of 3.5 cm). The solid line is the theoretical estimation of the thickness in absence of shrinkage and meniscus effects ($\rho = w / (2\pi e R^2)$ where ρ is the density of the solution, that is, close to the density of water, R is the radius of the Petri dish, w is the weight of the sample solution, and e is the thickness estimation of the solution).

As expected, the experimental data evidenced a linear correlation between the initial weight of chitosan solution in the Petri dish and the final hydrogel thickness, with a slope of about 1.0 for the different hydrogels. The values of hydrogel thicknesses stay below the calculated height of liquid water in absence of meniscus at the water/polystyrene interface. Decreasing the polymer concentration resulted in a significant shrinkage as a result of chain collapse assisted by easier disentanglements occurring during gelation. After sterilization, a further reduction in hydrogel thickness was measured and varied according to polymer concentration.

In agreement with the shrinkage phenomena displayed in Figure 5, the correspondence of the polymer concentration in the final hydrogels with the concentration of chitosan in the initial solutions displayed a linear increase regardless of the gelation route (Figure 6). After sterilization, the polymer concentration in hydrogels increased, the increase being more important at higher polymer concentration. This result cannot be explained only by the evolution of M_w after sterilization since steam sterilization yields a significant decrease of weight-average molecular mass. When the temperature rises to $121\text{ }^\circ\text{C}$ during sterilization, a fraction of hydrogen bonds are destroyed, but at the same time, the establishment of hydrophobic interactions are favored. Thus, the formation of new hydrophobic interactions could compensate for the destruction of hydrogen bonds and the decrease of molecular weight and explain the shrinkage of hydrogels.

The mechanical properties of these hydrogels were then evaluated by carrying out rheological measurements, tensile tests, and suturability tests.

Rheological Measurements. Rheological measurements were carried out to study the evolution of storage and loss moduli over angular frequency ranging from $100\text{--}0.05\text{ rad/s}$.

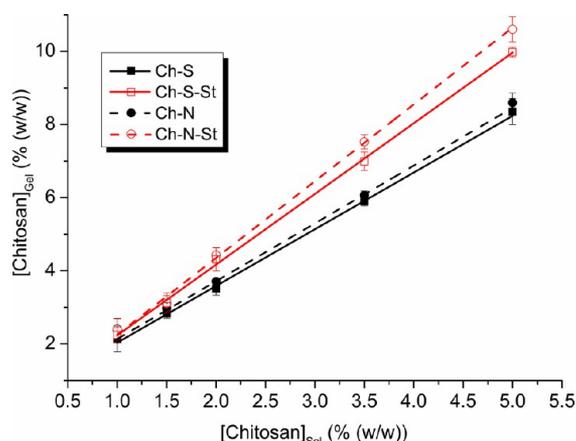


Figure 6. Final hydrogel polymer concentration ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}}$) in the nonsterilized (Ch-S and Ch-N) and sterilized hydrogels (Ch-S-St and Ch-N-St) as a function of the initial polymer solution concentration in the initial solution ($[\text{Chitosan}]_{\text{Sol}}$).

In the case of chitosan physical hydrogels, it has been reported a slight decrease of G' and increase of G'' at low frequencies,^{17,35} however, in general, these moduli are nearly frequency-independent. This was also observed in the present study. The influence of polymer concentration and sterilization step was characterized by measuring the hydrogel equilibrium storage modulus G_e (Figure 7), which corresponds to the plateau value of G' measured at low angular frequency.

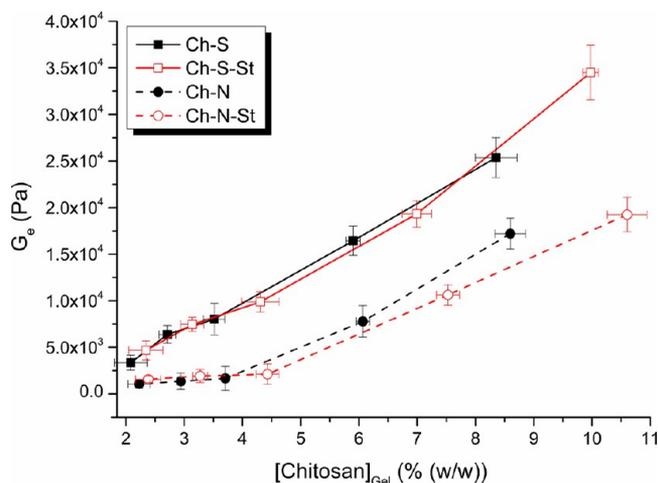


Figure 7. Influence of the final hydrogel polymer concentration ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}}$) on the equilibrium storage modulus (G_e) of nonsterilized (Ch-S and Ch-N) and sterilized chitosan hydrogels (Ch-S-St and Ch-N-St).

In the concentration range investigated, it was found that G_e increased with polymer concentration regardless of the gelation process and sterilization process; however, the curves corresponding to the hydrogels obtained via NH_3 induced-gelation (Ch-N hydrogels) displayed lower G_e . Also, it was observed from the curves of Ch-N hydrogels that when a critical chitosan concentration was attained ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}} = 4.5\%$), a stronger increase in G_e occurred. Similar results were reported by Montebault, Viton, and Domard,¹⁷ where a critical concentration of the chitosan solution ($=1.8\%$) used to produce hydrogels via NH_3 induced-gelation had to be reached to characterize the gel point. Indeed, it was found that above

this critical concentration, the time to reach the gel point was greatly reduced,¹⁷ which resulted from high viscosity and high number of chain entanglements favoring the formation of a high density of physical junctions in the hydrogel. Concerning NaOH induced-gelation, because of the faster diffusion and subsequent neutralization of protonated amino groups in chitosan chains as compared to NH_3 induced-gelation, the disentanglement of the polymer chains during neutralization was not complete, resulting in stiffer gels.

It was also observed that sterilized hydrogels exhibited higher G_e when compared to the corresponding nonsterilized hydrogels. However, for a given gelation process, a single pattern is obtained if G_e is plotted against the final polymer concentration. As discussed above, the impact of sterilization is to reduce the chain length, but a higher density of hydrophobic zones contributes to compensate for the evolution of G_e . Thus, the viscoelastic properties can be mainly related to the gelation route and to the final polymer concentration within the physical hydrogels.

Mechanical Behavior. Tensile tests performed at room temperature to establish the mechanical behavior of the physical chitosan hydrogels (thickness ≈ 1 mm) showed the elastomeric material behavior, with high values of elongation and a continuous increase in the stress with increasing strain (Figure 8). It was also observed that increasing the polymer concentration led to increased strain and stress. In agreement with rheological measurements, these tests showed that Ch-S hydrogels are stronger as compared to Ch-N hydrogels.

In the case of Ch-N hydrogel, the membrane formed at the surface was the major component contributing to its mechanical properties at low polymer concentration in solution ($[\text{Chitosan}]_{\text{Sol}} = 1.0\text{--}3.5\%$). At higher polymer concentrations, the rupture of the more fragile internal hydrogel was observed (e.g., at around 50% strain for Ch-10.0-N, see arrows in Figure 8b), which confirmed that even for the higher polymer concentrations, the surface hydrogel layer is mainly responsible for the value of ultimate tensile strength and elongation at break. A specific mechanical evaluation of the surface hydrogel layer of the Ch-N hydrogels showed that it exhibited comparable (or even higher) mechanical properties as compared to Ch-S hydrogels at similar polymer concentrations. Indeed, for the surface layer of the Ch-3.5-N bilayered system (thickness $\approx 0.14 \pm 0.01$ mm), the ultimate tensile strength and elongation at break were 1.42 ± 0.16 MPa and $65.1 \pm 3.4\%$, respectively, while the Ch-3.5-S hydrogel (thickness $\approx 0.99 \pm 0.07$ mm) presented an ultimate tensile strength of 0.87 ± 0.08 MPa and an elongation at break $56.8 \pm 4.9\%$.

In the case of Ch-5.0-S and Ch-10.0-S hydrogels, the formation of water droplets was observed at the surface of the hydrogels when the applied stress values reached 0.75–1.0 MPa, suggesting that the hydrostatic component of the stress tensor reached the swelling pressure and induced the expulsion of water from the hydrogel.

The ultimate tensile strength presented a marked dependence on the final polymer concentration and also on the processing route, as the Ch-S hydrogels showed higher ultimate tensile strength as compared to Ch-N hydrogels (Figure 9).

The elongation-at-break increased with increasing final polymer concentration, regardless of the gelation process and sterilization (Figure 10). However, in the case of Ch-S hydrogels, such a trend could be separated in two regimes, which revealed a critical gel concentration $[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}} = 4.5\%$ (i.e., $[\text{Chitosan}]_{\text{Sol}} = 2\%$; see Figure 6) above which the

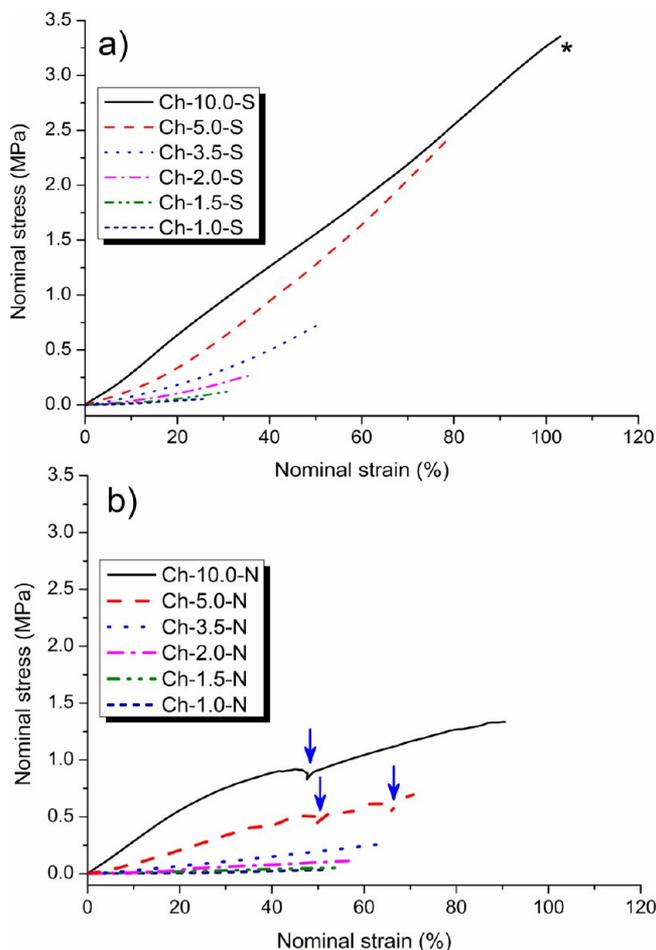


Figure 8. Nominal stress–strain diagram of chitosan hydrogels determined at room temperature as a function of the concentration of chitosan in the initial solution: (a) Ch-S and (b) Ch-N. *, maximum strength achieved without rupture of the Ch-10.0-S hydrogel.

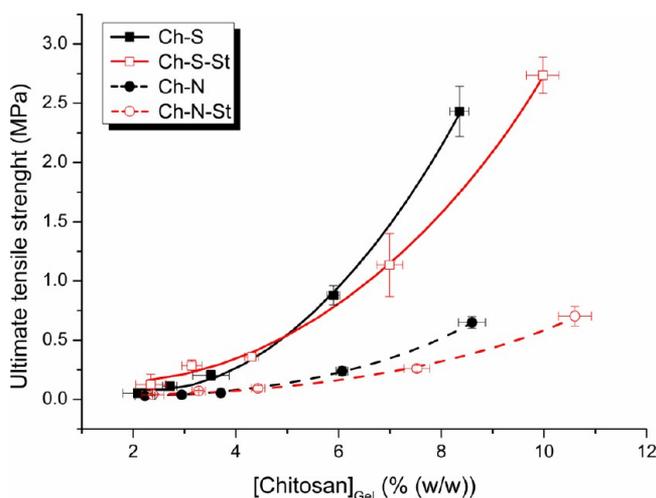


Figure 9. Ultimate tensile strength of the unsterilized (Ch-S and Ch-N) and sterilized hydrogels (Ch-S-St and Ch-N-St) as a function of final polymer concentration within gels ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}}$).

ultimate elongation strongly increases with polymer concentration as a result of a higher entanglement density preservation from the solution to the gel state. For the hydrogels produced via NH_3 induced-gelation, the formation of two different layers

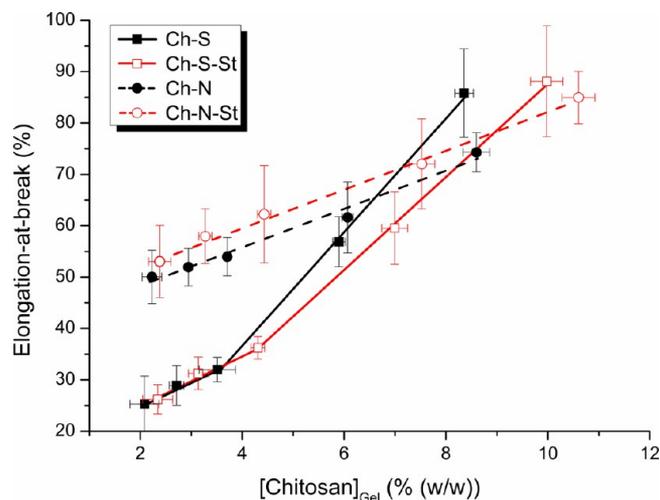


Figure 10. Elongation-at-break of the nonsterilized (Ch-S and Ch-N) and sterilized hydrogels (Ch-S-St and Ch-N-St) as a function of final polymer concentration in the gels ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}}$).

resulted in high apparent elongation-at-break, but a lower dependence on the polymer concentration was observed in this case.

The curves displaying the dependence of elastic modulus (E) of chitosan hydrogels on the final polymer concentration (Figure 11) show similar behavior as compared to the equilibrium storage modulus (G_e) obtained from rheological measurements with a ratio $E/G_e \approx 3$ for all hydrogels studied.

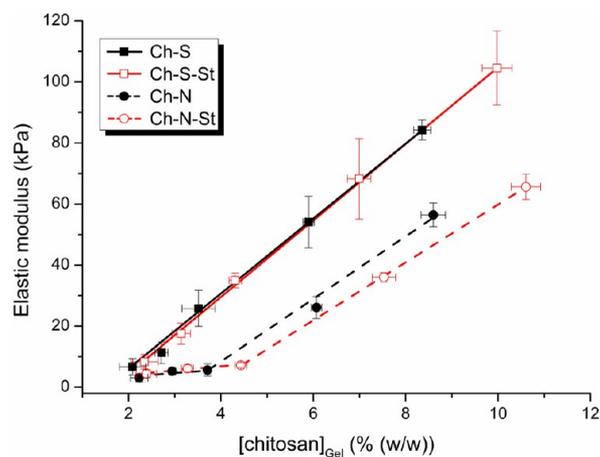


Figure 11. Elastic modulus of the nonsterilized (Ch-S and Ch-N) and sterilized hydrogels (Ch-S-St and Ch-N-St) as a function of final polymer concentration in the gels ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}}$).

Suture Test. In a large number of cases, biomaterial implant design requires the ability for suturing, the suture resistance being an essential parameter to evaluate the potential success for a given application. The hydrogels Ch-3.5-S and Ch-3.5-N were prepared as membranes with different thicknesses to investigate their impact on the ultimate suture load and suture resistance. Figure 12 shows the linear variation of the ultimate suture load with increasing thickness irrespective of the gelation route, the straight lines corresponding to hydrogels Ch-3.5-S and Ch-3.5-N, which displayed 63.3 and 10.9 gf mm^{-1} as slopes, respectively. The surface layer of the Ch-3.5-N hydrogels had constant thickness ($0.14 \pm 0.01 \text{ mm}$), and the ultimate suture strength for this hydrogel was only weakly

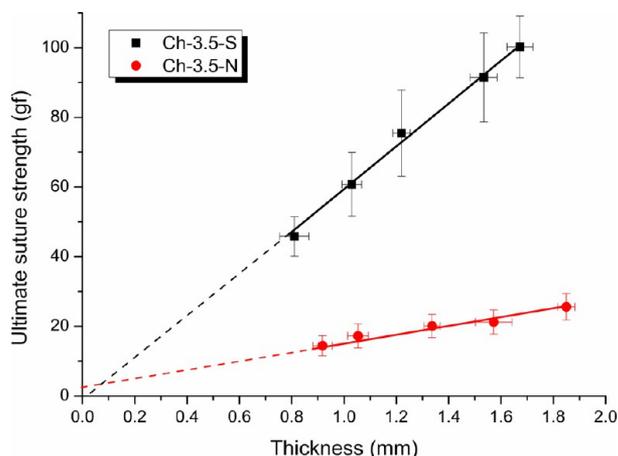


Figure 12. Influence of the thickness on the ultimate suture strength of the Ch-3.5-S and Ch-3.5-N hydrogels.

affected by the total thickness, confirming that its mechanical properties are mainly due to the contribution of the surface hydrogel layer.

The evolution of ultimate suture strength (normalized with respect to sample thickness (gf mm^{-1})) as a function of the final polymer concentration in the hydrogel (Figure 13) shows that a large increase of the normalized ultimate suture strength resulted from an increase of polymer concentration.

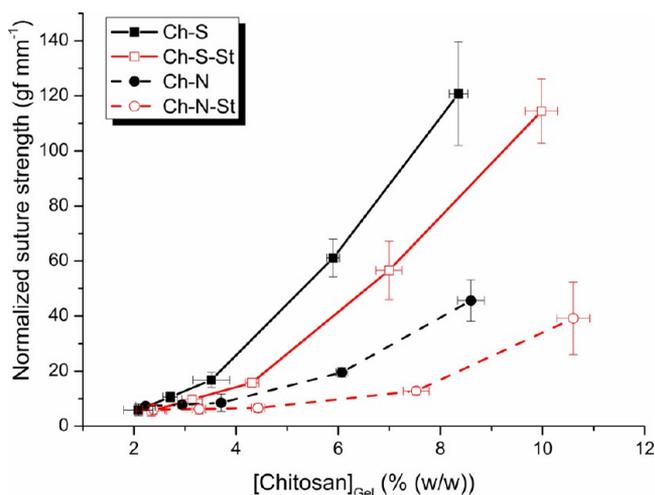


Figure 13. Normalized (ultimate) suture strength of the nonsterilized (Ch-S and Ch-N) and sterilized hydrogels (Ch-S-St and Ch-N-St) as a function of final polymer concentration in the hydrogel ($[\text{Chitosan}]_{\text{Gel}}$), obtained for hydrogel thicknesses of about 1 mm.

In contrast with the results of simple tensile tests, the sterilization step led to the decrease of the ultimate suture strength for all hydrogels. Apparently, the decrease of weight-average molecular weight provoked by the steam sterilization has a higher impact on suture resistance than the polymer concentration increase or the establishment of hydrophobic junctions.

Preliminary tests indicated that the biological applications of Ch-S hydrogels prepared with polymer solutions at concentrations higher than 1.5% (w/w) were suturable as no tears were observed after fixation by suture points. However, Ch-S hydrogels, which were prepared from more concentrated chitosan solutions (>2%), were too rigid and not suited for

the targeted application as they could not be fitted to the curvature of the heart of the rats, consequently representing a hindrance for the heart muscle.

Cardiac Biocompatibility of Chitosan Hydrogels.

Chitosan physical hydrogels similar to this work were previously studied to establish their biocompatibility and resorbability on a rat model (subcutaneous implants).^{36,37} In this work, chitosan hydrogels were tested *in vivo* to assess their biocompatibility and biofunctionality using a rat model of myocardial infarction. The Ch-2.0-S-St and Ch-1.5-S-St hydrogels were implanted onto the epicardial surface overlaying the infarcted area of rats. One month after their epicardial delivery, the chitosan hydrogels were macroscopically visualized on the surface of the heart (Figure 14a–d). For a closer analysis, 20 sections per heart were generated, and some of these sections were stained with hematoxylin and eosin to analyze foreign body response with respect to inflammation, granulomatous reaction, and epicardial fibrosis. All implanted hydrogels were visible on the surface of hearts at one month after implantation, with partial degradation of Ch-1.5-S-St hydrogel but no macroscopic degradation were observed with Ch-2.0-S-St hydrogel (Figure 14a–d). The degradation of Ch-1.5-S-St hydrogels was accompanied by cell infiltration composed predominantly of mononuclear cells (Figure 14c,d). In contrast, Ch-2.0-S-St hydrogels were encapsulated by a fibrous tissue with the accumulation of multinucleated giant cells (see arrowhead in Figure 14b) demonstrating the presence of moderate foreign body reaction (Figure 14a,b).

In parallel to morphological assessment, we also evaluated the functional impact of epicardial delivery of Ch-2.0-S-St and Ch-1.5-S-St hydrogels using transthoracic echocardiography to monitor if chitosan hydrogels have a deleterious effect on cardiac function (Figure 14e,f). Our assessments show no significant differences between three experimental groups, thereby demonstrating the biocompatibility and safety of chitosan hydrogels. After compilation of morphological and functional results, we speculated that Ch-1.5-S-St is more appropriate for cardiac tissue engineering.

Conclusions. Physical hydrogels containing only chitosan and water, that is, exempt of cross-linkers and organic solvents, were successfully prepared via NaOH and NH_3 induced-gelation processes. According to the initial polymer concentration and to the gelation route, the hydrogels displayed distinct physicochemical and mechanical properties. The steam sterilization of the chitosan hydrogels induced the decrease of the polymer average molecular weight; however, it was observed that increasing the storage time in deionized water favored a slow self-cross-linking process, indicating that these hydrogels could be stored for long periods with improved mechanical properties. The increase of the initial concentration of the chitosan solution led to hydrogels displaying improved mechanical properties above a critical initial chitosan concentration. Indeed, higher solution concentrations (>2.0%) resulted in hydrogels exhibiting improved mechanical properties due to the increase of chain entanglements. Such results clearly show that the physicochemical and mechanical properties of chitosan hydrogels are strongly affected by the initial polymer concentration and by the gelation process. Thus, these properties can be modulated according to processing conditions, this modulation also impacting the resorption and biological responses in terms of cellular infiltration and foreign body reaction. Chitosan hydrogels prepared from 1.5% (w/w) solutions were perfectly incorporated and presented partial

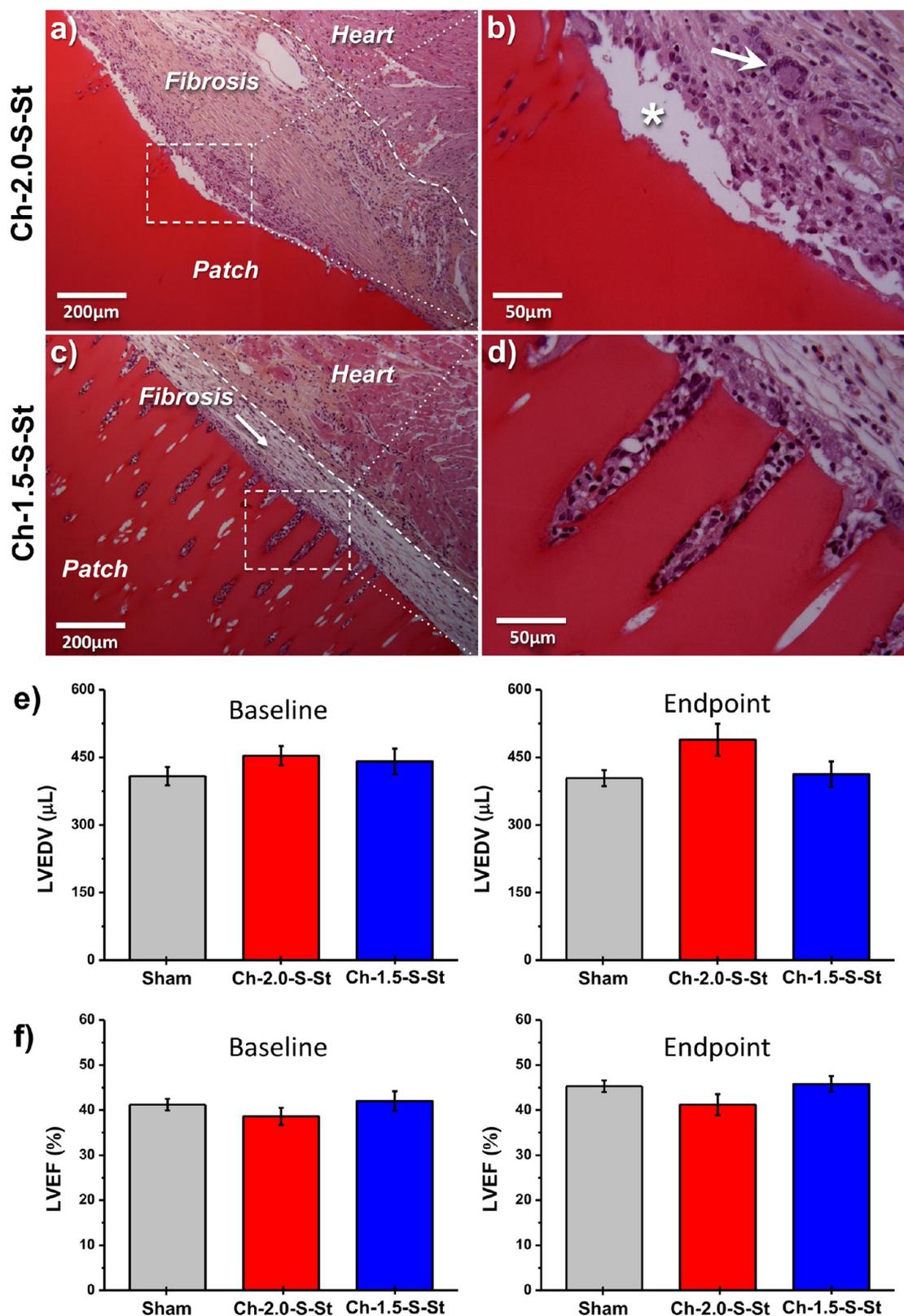


Figure 14. Evaluation of cardiac biocompatibility of Chitosan hydrogels. (a–d) Macroscopic visualization of epicardially delivered Chitosan hydrogels, one month after implantation. Hematoxylin and eosin staining demonstrated the presence of Chitosan hydrogels (in red) on the surface of the heart. Note the presence of fibrous tissue, multinucleated giant cells (see arrowhead in panel b), and partial incorporation (see asterisk in panel b) with Ch-2.0-S-St hydrogels (a, b). In contrast, Ch-1.5-S-St hydrogels were perfectly incorporated and present partial degradation accompanied by mononuclear cell infiltration (c, d). (e, f) Functional evaluation of epicardially delivered Chitosan hydrogels. Note the absence of significant differences between the groups demonstrating the biocompatibility of Chitosan hydrogels. LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction. Bars: 200 μm (a, c); 50 μm (b, d).

degradation accompanied by mononuclear cell infiltration. Further developments of chitosan hydrogel membranes for myocardial regeneration after myocardial infarction will focus on accelerating the resorption kinetics, macrophagic infiltration, and polarization of macrophage phenotype toward a reparative pattern (M2) to favor tissue reconstruction. Taken together, these results demonstrate that Chitosan hydrogels present all optimal physicochemical, mechanical, and biological properties for cardiac tissue engineering applications.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: laurent.david@univ-lyon1.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the ANR-12-RPIB_0015, LabEx REVIVE (ANR-10-LABX-73). S.E.B. was supported by a fellowship from the Conseil Regional d'Ile de France (DIM Biotherapies), and the PhD fellowship of A.F. was supported by the Brazilian agencies CAPES and CNPq.

REFERENCES

- (1) Kochupura, P. V.; Azeloglu, E. U.; Kelly, D. J.; Doronin, S. V.; Badylak, S. F.; Krukenkamp, I. B.; Cohen, I. S.; Gaudette, G. R. Tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix provides regional mechanical function. *Circulation* **2005**, *112* (9), 1144–1149.
- (2) Robinson, K. A.; Li, J. S.; Mathison, M.; Redkar, A.; Cui, J. H.; Chronos, N. A. F.; Matheny, R. G.; Badylak, S. F. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. *Circulation* **2005**, *112* (9), 1135–1143.
- (3) Seif-Naraghi, S. B.; Horn, D.; Schup-Magoffin, P. A.; Madani, M. M.; Christman, K. L. Patient-to-Patient Variability in Autologous Pericardial Matrix Scaffolds for Cardiac Repair. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2011**, *4* (5), 545–556.
- (4) Agbulut, O.; Vandervelde, S.; Al Attar, N.; Larghero, J.; Ghostine, S.; Léobon, B.; Robidel, E.; Borsani, P.; Le Lor'h, M.; Bissery, A.; Chomienne, C.; Bruneval, P.; Marolleau, J.-P.; Vilquin, J.-T.; Hagège, A.; Samuel, J.-L.; Menasché, P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *44* (2), 458–463.
- (5) Chi, N. H.; Yang, M. C.; Chung, T. W.; Chou, N. K.; Wang, S. S. Cardiac repair using chitosan-hyaluronan/silk fibroin patches in a rat heart model with myocardial infarction. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (1), 591–597.
- (6) Varum, K. M.; Myhr, M. M.; Hjerde, R. J. N.; Smidsrod, O. In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr. Res.* **1997**, *299* (1–2), 99–101.
- (7) Hirano, S.; Kondo, S.; Ohe, Y. Chitosan gel: a novel polysaccharide gel. *Polymer* **1975**, *16* (8), 622.
- (8) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144* (1), 51–63.
- (9) Zhao, D. K.; Huang, J.; Hu, S.; Mao, J. W.; Mei, L. H. Biochemical activities of N,O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85* (4), 832–837.
- (10) Kind, G. M.; Bines, S. D.; Staren, E. D.; Templeton, A. J.; Economou, S. G. Chitosan: evaluation of a new hemostatic agent. *Curr. Surg.* **1990**, *47* (1), 37–9.
- (11) Ishihara, M.; Ono, K.; Sato, M.; Nakanishi, K.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsui, T.; Hattori, H.; Fujita, M.; Kikuchi, M.; Kurita, A. Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Repair Regen.* **2001**, *9* (6), 513–521.

- (12) Ono, K.; Ishihara, M.; Ozeki, Y.; Deguchi, H.; Sato, M.; Saito, Y.; Yura, H.; Kikuchi, M.; Kurita, A.; Maehara, T.; et al. Experimental evaluation of photocrosslinkable chitosan as a biologic adhesive with surgical applications. *Surgery* **2001**, *130* (5), 844–850.

- (13) Roberts, G. A. F. *Chitin Chemistry*; Macmillan Press Ltd: London, 1992.

- (14) Delezuk, J. A. D.; Cardoso, M. B.; Domard, A.; Campana-Filho, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. *Polym. Int.* **2011**, *60* (6), 903–909.

- (15) Lamarque, G.; Cretenet, M.; Viton, C.; Domard, A. New route of deacetylation of alpha- and beta-chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1380–1388.

- (16) Vachoud, L.; Zydowicz, N.; Domard, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302* (3–4), 169–177.

- (17) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 653–662.

- (18) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials* **2005**, *26* (8), 933–943.

- (19) Roberts, G. A. F.; Taylor, K. E. Chitosan gels 0.3. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde. *Makromol. Chem.* **1989**, *190* (5), 951–960.

- (20) Draget, K. I.; Varum, K. M.; Moen, E.; Gynnild, H.; Smidsrod, O. Chitosan cross-linked with mo(vi) polyoxyanions - a new gelling system. *Biomaterials* **1992**, *13* (9), 635–638.

- (21) Wang, H.; Shi, J.; Wang, Y.; Yin, Y.; Wang, L.; Liu, J.; Liu, Z.; Duan, C.; Zhu, P.; Wang, C. Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. *Biomaterials* **2014**, *35* (13), 3986–3998.

- (22) Ishihara, M.; Obara, K.; Ishizuka, T.; Fujita, M.; Sato, M.; Masuoka, K.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsui, T.; Hattori, H.; Kikuchi, M.; Kurita, A. Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *64A* (3), 551–559.

- (23) Fujita, M.; Ishihara, M.; Morimoto, Y.; Simizu, M.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsui, T.; Takase, B.; Hattori, H.; Kanatani, Y.; Kikuchi, M.; Maehara, T. Efficacy of photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 in a rabbit model of chronic myocardial infarction. *J. Surg. Res.* **2005**, *126* (1), 27–33.

- (24) Obara, K.; Ishihara, M.; Ishizuka, T.; Fujita, M.; Ozeki, Y.; Maehara, T.; Saito, Y.; Yura, H.; Matsui, T.; Hattori, H.; Kikuchi, M.; Kurita, A. Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Biomaterials* **2003**, *24* (20), 3437–3444.

- (25) Moore, G. K.; Roberts, G. A. F. Chitosan gels 0.2. Mechanism of gelation. *Int. J. Biol. Macromol.* **1980**, *2* (2), 78–80.

- (26) Montembault, A.; Tahiri, K.; Korwin-Zmijowska, C.; Chevalier, X.; Corvol, M. T.; Domard, A. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie* **2006**, *88* (5), 551–564.

- (27) Ladet, S. G.; Tahiri, K.; Montembault, A. S.; Domard, A. J.; Corvol, M. T. M. Multi-membrane chitosan hydrogels as chondrocytic cell bioreactors. *Biomaterials* **2011**, *32* (23), 5354–5364.

- (28) Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polym. Bull.* **1991**, *26* (1), 87–94.

- (29) Jarry, C.; Chaput, C.; Chenite, A.; Renaud, M. A.; Buschmann, M.; Leroux, J. C. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *58* (1), 127–135.

- (30) San Juan, A.; Montembault, A.; Gillet, D.; Say, J. P.; Rouif, S.; Bouet, T.; Royaud, I.; David, L. *Iop, Degradation of Chitosan-Based Materials after Different Sterilization Treatments*; 6th Eeigm International Conference on Advanced Materials Research, 2012, Vol. 31.

- (31) Agbulut, O.; Vandervelde, S.; Al Attar, N.; Larghero, J.; Ghostine, S.; Leobon, B.; Robidel, E.; Borsani, P.; Le Lor'h, M.; Bissery, A.; Chomienne, C.; Bruneval, P.; Marolleau, J. P.; Vilquin, J. T.; Hagege, A.; Samuel, J. L.; Menasché, P. Comparison of human

skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133(+) progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *44* (2), 458–463.

(32) Lamarque, G.; Lucas, J. M.; Viton, C.; Domard, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: Role of various structural parameters. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 131–142.

(33) Ladet, S.; David, L.; Domard, A. Multi-membrane hydrogels. *Nature* **2008**, *452* (7183), 76–79.

(34) Nie, J.; Lu, W.; Ma, J.; Yang, L.; Wang, Z.; Qin, A.; Hu, Q. Orientation in multi-layer chitosan hydrogel: morphology, mechanism, and design principle. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 7635.

(35) Clark, A. H.; Rossmurphy, S. B. Structural and mechanical-properties of bio-polymer gels. *Adv. Polym. Sci.* **1987**, *83*, 57–192.

(36) Rami, L.; Malaise, S.; Delmond, S.; Fricain, J.-C.; Siadous, R.; Schlaubitz, S.; Laurichesse, E.; Amedee, J.; Montembault, A.; David, L.; Bordenave, L. Physicochemical modulation of chitosan-based hydrogels induces different biological responses: Interest for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2014**, *102* (10), 3666–3676.

(37) Malaise, S.; Rami, L.; Montembault, A.; Alcouffe, P.; Burdin, B.; Bordenave, L.; Delmond, S.; David, L. Bioresorption mechanisms of chitosan physical hydrogels: A scanning electron microscopy study. *Mater. Sci. Eng., C* **2014**, *42*, 374–384.

[Elaboration de différents biomatériaux dans une perspective thérapeutique de l'insuffisance cardiaque]

L'insuffisance cardiaque est un problème majeur de santé publique. Malgré l'arsenal thérapeutique existant, pour certains patients, la greffe d'un nouveau cœur reste la seule option. Parmi les stratégies envisagées, la régénération du tissu cardiaque par implantation de nouvelles cellules fonctionnelles est une option thérapeutique intéressante. L'utilisation de support biologique modulable mécaniquement et chimiquement pour apporter les cellules d'intérêt au cœur est en plein essor. Dans cette étude, trois biomatériaux différents ont été évalués dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque : des feuilles de cellules souches, des matrices en nanofibres de collagène, et des hydrogels de chitosane.

1) L'utilisation de **feuilles** de cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC) ou de myoblastes associées à des **progéniteurs cardiaques murins** a montré un intérêt thérapeutique dans un modèle animal de cardiomyopathie dilatée mais a également mis en évidence des difficultés d'obtention et de manipulation de ce type de biomatériau constitué uniquement de cellules.

2) L'étude principale du travail de thèse a consisté au développement d'une **matrice formée de nanofibres de collagène** constituant un support pour des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS-CM) pour le traitement des cardiomyopathies dilatées. La mise en place des conditions d'obtention ainsi qu'une analyse de la biocompatibilité des matrices ont été réalisées. L'implantation des patches de collagène a montré une amélioration significative de la fonction cardiaque mais également l'induction d'un remodelage bénéfique. L'association des matrices de collagène avec une couche de fibrine a permis l'amélioration de la rétention des cellules sur les biomatériaux. L'alignement des nanofibres est actuellement en cours d'étude afin de potentialiser la maturation et l'organisation des cellules hiPS-CM.

3) Une dernière étude concerne l'**évaluation biologique d'un hydrogel naturel de chitosane** non cellularisé dans un modèle d'infarctus du myocarde. Le chitosane est une molécule naturelle dont le potentiel angiogénique a été démontré. L'analyse de ces hydrogels a montré une biocompatibilité avec l'absence d'effet délétère sur la fonction cardiaque. L'innocuité des hydrogels de chitosane étant établie, il pourrait être envisagé, par la suite, d'utiliser ces supports pour apporter au cœur des molécules issues du sécrétome de cellules souches mésenchymateuse pour améliorer différents paramètres cardiaques.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que, dans un contexte d'insuffisance cardiaque, la greffe épiscardique de biomatériaux, cellularisés ou non, représente une stratégie thérapeutique prometteuse avec une capacité de modulation physico-chimique importante.

Mots clés • Biomatériaux • Feuille de cellule • Collagène • Chitosane • Insuffisance cardiaque

[Development of different types of biomaterials focused on heart failure therapy]

Heart failure is a major public health concern. Despite the existing therapeutic arsenal, for some patients, a heart transplantation remains the only option. Among the planned strategies, the regeneration of heart tissue by implantation of new functional cells is an interesting therapeutic option. The use of biological support mechanically and chemically modulated to bring interested cells to the heart is booming. In this study, three different biomaterials have been evaluated in animal model of heart failure: stem cell sheets, scaffolds of collagen nanofibers, and chitosan hydrogels.

(1) The use of cell sheets of adipose derived stem cells (ADSC) or myoblasts associated with murine cardiac progenitors has shown therapeutic interest in an animal model of dilated cardiomyopathy but has also highlighted many difficulties of obtaining and handling this type of biomaterial entirely composed of cells.

(2) The main study of the doctoral work consisted in the development of a collagen nanofibers scaffold able to support cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells (hiPS-CM) for the treatment of dilated cardiomyopathy. The establishment of conditions to obtain and evaluate the biocompatibility of collagen scaffolds have been carried out. The implantation of collagen scaffold showed a significant improvement of cardiac function but also the induction of a beneficial remodelling. The association of the patch with a layer of fibrin hydrogel has allowed the improvement of cell retention on biomaterial. Alignment of nanofibers is currently being studied to potentiate the hiPS-CM cell maturation and organisation.

(3) The last study concerns the biological evaluation of a natural chitosan hydrogel without cell in a model of myocardial infarction. Chitosan is a natural molecule that has been shown to display angiogenic potential. The analysis of these hydrogels has showed biocompatibility with the absence of deleterious effect on cardiac function. The safety of chitosan hydrogels being established, it might be considered, subsequently, to use these patch to bring in the heart molecules from the secretome of MSC to improve various cardiac parameters.

To summarize, these results suggest that, in the context of heart failure, epicardially delivery of biomaterials, with or without cells, represents a promising therapeutic strategy with an important capacity of physico-chemical modulation.

Keywords • Biomaterials • Cell sheet • Collagen • Chitosan • heart failure