



Utilisation de la bio-impression pour développer un patch cardiaque de grade clinique

Rose Guesdon

► To cite this version:

Rose Guesdon. Utilisation de la bio-impression pour développer un patch cardiaque de grade clinique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Cité, 2025. Français. <NNT : 2025UNIP5027>. <tel-05431680>

HAL Id: tel-05431680

<https://theses.hal.science/tel-05431680v1>

Submitted on 26 Dec 2025

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.



HAL Authorization

Université Paris Cité

Ecole doctorale BIO Sorbonne Paris Cité (ED 562)

PARCC – Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire de Paris
Physiopathologie intégrative et thérapie des maladies cardiaques – INSERM
U970

Utilisation de la bio-impression pour développer un patch cardiaque de grade clinique

Par Rose GUESDON

Thèse de doctorat de Physiologie – Physiopathologie

Dirigée par Albert HAGEGE

Présentée et soutenue publiquement le 25 juin 2025

Devant un jury composé de :

Catherine LE VISAGE , DR	Université de Nantes	Rapporteuse
Valérie PLANAT-BENARD , PU	Université de Toulouse	Rapporteuse
Caroline LAROYE , MCU-PH	Université de Lorraine	Examinatrice
Onnik AGBULUT , PU	Sorbonne Université	Examineur
Philippe MENASCHE , PU-PH	Université Paris Cité	Membre invité
Fabien GUILLEMOT , DR	Poietis	Membre invité
Albert HAGEGE , PU-PH	Université Paris Cité	Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à adresser mes sincères remerciements à chaque membre de mon jury de thèse pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon travail, ainsi que pour la qualité de leurs remarques scientifiques qui ont grandement enrichi cette étape finale de mon parcours doctoral. Je remercie ainsi le Mme **Catherine Le Visage** et le Mme **Valérie Planat-Benard** en qualité de rapporteurs, le M. **Onnik Agbulut** et le Mme **Caroline Laroye** en qualité d'examineurs.

Je remercie également **Jean-Sébastien Silvestre**, comme directeur du PARCC, pour m'avoir accueillie dans le centre et pour m'avoir donné les moyens de mener mon projet jusqu'à la fin.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, **Albert Hagège**, ainsi qu'à **Philippe Menasché**. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accepté dans votre équipe. Merci pour votre soutien dans mes moments de doutes. Je retiendrai votre détermination, votre intégrité et votre curiosité scientifique sans limites. Encore merci pour tout le temps que vous m'avez accordé et votre bienveillance à mon égard.

Je souhaite également remercier **Fabien Guillemot** et **Bruno Brisson** pour la confiance qu'ils m'ont accordée en soutenant financièrement ce projet de thèse. Grâce à POIETIS, j'ai eu l'opportunité de découvrir le monde de la recherche privée et de me plonger dans l'univers fascinant de la bio-impression 3D, qui m'était jusque-là inconnu. Je suis fière de pouvoir dire que j'ai un peu contribué, au sens propre comme au figuré, à la construction d'une NGB-C. J'en profite pour remercier **Laurence Hutter** qui m'a accompagnée durant les premiers mois après mon arrivée à Bordeaux. Ton expertise et ton soutien m'ont grandement manqué après ton départ.

Merci à REVATIS et plus particulièrement à **Didier Serteyn** et **Justine Ceusters** d'avoir accepté la collaboration et de me fournir leurs précieuses cellules. Sans votre contribution, mon travail serait bien différent de celui que je défends fièrement aujourd'hui. Merci pour tous vos conseils scientifiques et votre bienveillance lors de nos réunions franco-belges !

À présent, j'aimerais remercier du plus profond de mon cœur l'équipe 6B qui est aujourd'hui ma seconde famille. Parmi vous, j'ai trouvé des amies (désolée Bradel, mais ici, le féminin l'emporte) d'une valeur inestimable, alors merci :

À **Valérie**, de qui j'avais entendu parler incessamment lors de mon arrivée en stage au

laboratoire. Mais, qui pouvait bien être cette femme dont les filles parlaient sans cesse ? Lorsque tu es revenue, j'ai compris pourquoi tu leur manquais tant. Tu es devenue ma maman du labo pendant ces quatre années, celle à qui je pouvais poser toutes mes questions, même les plus bêtes (je sais, il n'y pas de question bête). Merci de m'avoir partagé tout ton savoir et ta précieuse expérience dans bien des domaines. Désormais, tu pourras parler de moi dans tes anecdotes « à l'époque » (mais uniquement en bien). Merci d'être l'âme de cette équipe et de m'avoir guidée dans la grande aventure de la thèse. Sans toi, je n'aurais été qu'un pioupiou désorienté (comment savoir si je dois faire des coupes en paraffine ou en congelé ?).

À **Céline**, aka Célinou Mimi Marignou, tu es ma rencontre la plus extraordinaire de ces quatre dernières années. Tu as d'abord été ma copine de stage, puis ma copine de thèse et aujourd'hui je sais que tu fais partie de mes amies les plus chères. Merci pour les petits mots sur mes post-it du bureau, pour ton soutien indéfectible en toutes situations et ton amitié. Je t'admire tellement pour ta rigueur, ta détermination et ta confiance en toi qui semblent sans faille ! À défaut de rester ma collègue pour la vie (quoiqu'on ne sait jamais), j'espère que l'on restera des copines de fête, de course à pied, de rando, de puzzle, de disco (vive ABBA) et de tout ce que nous aurons la chance de partager (peut-être d'autres aventures à Vancouver ?). Encore merci d'avoir illuminé chacune de mes journées durant cette aventure que l'on a partagée.

À **Anne**, ma copine Miffyfique à paillettes. Je suis très reconnaissante d'avoir eu la chance de croiser ta route. Merci pour toutes nos longues discussions à propos d'ongles, de maquillage, de décors, d'arc-en-ciel et de licornes. Merci d'avoir été mon binôme de réf que les autres n'avaient pas (les nullos). Ton départ a été difficile, mais je sais que nous resterons amies (par le pouvoir magique du nail art et des fleurs). J'espère que tu reviendras nous voir souvent à Paris et je viendrais sans hésitation te rendre visite au pays des canelés.

À **Chloé**, ma mentor, celle auprès de qui j'ai tout appris (notamment les effrayantes dilutions en cascade). Merci pour tout, car je ne serais pas là si tu ne m'avais pas fait confiance pour être ta stagiaire il y a quatre ans de ça. À tes côtés, j'ai découvert tous les aspects de la recherche en laboratoire, l'entraide, les bons moments, mais aussi les grosses galères (c'était du PBS ou de l'éthanol dans la seringue...?). Je te suis sincèrement reconnaissante pour la patience et la pédagogie dont tu as fait preuve avec moi. Merci de m'avoir transmis ton amour pour tes ratounets, qui sont, par la suite, devenus les miens. Je suis très fière d'avoir pu continuer ton projet avec tout le savoir-faire que j'ai acquis entre mes mains de bucheronne à

paillettes.

À **Manon**, qui a été un exemple de force et de détermination lors de mon stage de M2. Merci de m'avoir appris à ne pas baisser les bras et à persévérer. Tes expressions fétiches « mon petit » et « boooooon » résonnent toujours entre les murs du laboratoire et je suis fière de les dire à mon tour aux nouveaux stagiaires. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et bienveillante avec moi. Je n'oublie pas notre promesse d'aller en vacances bronzer sur une plage.

À **Aline**, notre rayon de soleil brésilien. Merci pour ton énergie qui me mettait de bonne humeur au quotidien. Entendre tes playlists à travers le laboratoire était toujours un plaisir ! Merci d'avoir pris le temps de me conseiller pour mon projet. Ton regard scientifique a été d'une grande aide (et tes pão de queijo aussi !).

À **Serena**, ma toute première stagiaire. Merci pour ton implication et ton dévouement dans mon projet de thèse. Tu as été d'une grande aide et ton autonomie m'a soulagée d'une grande charge de travail. Merci d'avoir été un soutien et une compagnie essentielle lors de nos longues heures de chirurgie au sous-sol sans fenêtres. Nos discussions franco-anglaises ont adouci ces moments de stress. Grazie per tutto !

À **Ayma**, ma nouvelle voisine de bureau, la relève des doctorantes de l'équipe 6B. Merci pour ta spontanéité et ta joie. Tes claquements de doigts sous mon nez et tes drôles de mots (wuikend, ciriales, ...) me manqueront presque (ne t'emballes pas, j'ai dit presque). Saches que tu viens de démarrer une aventure incroyable dans une merveilleuse équipe, alors profite de chaque instant. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

À **Axelle**, pour ton énergie débordante (et parfois incontrôlable). Je sais que je pourrais toujours compter sur toi pour aller boire un coup (ou deux, ou dix ...) et faire la fête jusqu'au bout de la nuit !

À **Sylia**, ma copine des îles. Ton arrivée dans l'équipe m'a fait beaucoup de bien et je suis sincèrement heureuse de t'avoir rencontrée. Merci pour tes sourires, ta curiosité et ta gentillesse. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de résultats statistiques pour la suite de ta thèse ! I will miss you.

À **Clara**, notre copine du 3^{ème} étage. Merci pour tous ces bons moments à discuter de tout et de rien (et surtout de ton chat). Ton humour et ton vocabulaire argotique m'auront marquée et fait beaucoup rire. Je suis convaincue que ton projet de thèse finira par aboutir, tu

es une battante, ne lâches rien !

À **Claire**, ma copine fan de plante et de danse. J'aurais adoré qu'on ait plus de temps pour travailler ensemble, je suis convaincue qu'on aurait formé un duo d'enfer ! Mais au-delà du labo, je suis surtout reconnaissante de pouvoir toujours te compter parmi mes amies, j'ai hâte de faire des supers randos avec toi. Merci pour tout, vraiment.

À **Bradel**, le seul garçon qui aura l'honneur de faire partie de la dreamteam. Merci pour nos discussions de petits stagiaires et nos rires (trop bruyants d'après les grandes doctorantes du bureau d'à côté) !

À **Fabiana**, merci d'avoir participé à la bonne humeur du labo durant ton stage. Tu seras toujours la bienvenue dans l'équipe !

Merci à toute l'équipe 6A, notamment **José** et **Stéphane** pour leurs nombreux conseils scientifiques et **Alexandra** et **Feriel** pour les petits encouragements que nous nous sommes donnés lors de nos longues heures de chirurgies.

À présent, je souhaite remercier tous les merveilleux collègues que j'ai eu la chance de rencontrer lors de mon arrivée à Poietis :

Manon, qui a été mon binôme tout au long de cette année chargée en émotion. Merci d'avoir été ma copine de labo, ma copine de soirée et ma copine de sport. Merci de m'avoir initié à la pétanque et surtout au Crossfit. Grâce à toi, j'ai révélé mon énorme potentiel ! Je n'oublierai jamais ce petit bout de vie ensoleillé à tes côtés.

Etienne, le 3^{ème} membre du trio des biologistes. Merci de m'avoir appris tout ce que tu savais sur Pi3 et la bio-impression. Merci d'avoir été bien plus qu'un collègue et d'être un ami sur qui je peux compter. Je regrette toutes les soirées Koh-Lanta auxquelles je n'ai pas pu participer ...

Deesphika, Thank you for your positivity, you helped me gain confidence and not be afraid to speak up in English! Your determination and patience are truly inspiring. Don't give up, I'm sure everything will fall into place.

Jérémie, notre duo Tic et Tac me manque beaucoup. J'adorais retrouver tes petits mots

dans mes carnets après une longue semaine de chirurgie à Paris. Merci pour ton amitié intense et passionnée durant tes 6 mois de stage. Ton départ a été un vrai pincement au cœur. J'espère que l'on saura conserver ce lien si important à mes yeux. PS : je ne t'ai pas attendu pour prendre des cours de rock, mais je serai ravie d'aller danser avec toi !

Anatole, le Montanox boy qui se prenait pour un l'un des nôtres (tuer des cellules, ça ne fait pas de toi un biologiste). Merci d'avoir participé à rendre mon année à Poietis inoubliable. Merci pour ton humour douteux et tous les fous rires que nous avons eu (je n'arriverai jamais à oublier que ton coloc a mangé la rose que l'on m'avait offerte au bar).

Hélène, merci de m'avoir accueillie au laboratoire, de m'avoir patiemment tout expliqué et tout appris. Tu as été ma première amie dans le bureau et ta démission a été douloureuse. Ta joie de vivre et ta douce folie ont été un véritable rayon de soleil à un moment où j'en avais profondément besoin. PS : j'écoute toujours Disiz en pensant à toi, tu ne quitteras jamais ma mémoire, ni ma playlist !

Guillaume, je souhaite sincèrement te remercier pour la douceur que tu as su m'apporter alors que j'étais un peu perdue. Merci pour cette parenthèse fabuleuse qu'a été notre relation, je t'en suis profondément reconnaissante. J'attends avec impatience de rencontrer Billie, le mouton au pays du canard. J'espère réellement que nos chemins se recroiseront au détour d'une bière ou d'une séance de Crossfit (tu vas voir, je suis devenue une machine !).

Merci également à **Eva, Annick, Karine, Marc, Jessica, Thomas, Mathieu, Maxime, Charles, Bertrand, Antonio, et Monique** pour leur bienveillance et leur précieuse aide durant tout mon séjour dans la Poieteam. Même si ce chapitre est clos, vous resterez dans tous les bons souvenirs que j'ai de mon passage à Bordeaux.

Mes remerciements vont également aux différentes plateformes du PARCC et à toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de pouvoir travailler :

Le personnel de l'ERI, **Nicolas, Corina, Imen et Rex**. Merci d'avoir pris soin de mes animaux pendant des mois. Grâce à vos conseils et recommandations, mon expérimentation animale a pu se dérouler dans les meilleures conditions.

Irmine, qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions concernant le bien-

être animal et pour me former à de nouveaux gestes expérimentaux. Ta passion pour la recherche est communicative.

La plateforme Histologie, dirigée par **Corinne** et **Mathilde**, dont la maîtrise du scanner de lames m'a permis de gagner un temps précieux.

La plateforme Cytométrie, qui ne serait rien sans **Camille**, qui m'a tout appris de l'utilisation du FACS et du design de panel !

La plateforme d'imageries du vivant, que j'ai découverte récemment grâce à **Daniel**. Merci pour ta disponibilité, ta patience et ta bienveillance.

La plateforme administrative, qui nous est indispensable et sans qui le PARCC s'arrêterait de tourner. Merci à **Véronique**, **Dominique** et **Cyril** d'être à notre écoute et de vous démenner pour nous.

La réussite de ce projet a également reposé sur l'aide précieuse de personnes extérieures, que je souhaite remercier très sincèrement pour leur engagement et leur soutien :

Merci à **Audrey Cras**, de l'Hôpital St Louis, qui a accepté de m'aider et de participer à mes CSI dans une grande bienveillance. Votre expérience dans les CSM de cordon m'aura été très enrichissante.

Un immense merci à **Alexandra Gaubert**, de la plateforme de rhéologie de l'Université de Bordeaux, pour avoir répondu à mon appel désespéré concernant la rhéologie !

Merci à la plateforme CytoFacility de Bordeaux, plus particulièrement **Atika Zouine** et **Vincent Pitard** pour m'avoir aidé dans mes nombreuses expériences de FACS.

Je remercie **Gilles Renault** et **Franck Lager**, de la plateforme d'imageries du vivant de Cochin, pour m'avoir dispensé une formation express et analysé mes données d'échocardiographie en un temps record.

Lors de ma deuxième année, j'ai eu la chance de participer au programme de mentorat de l'association Femmes & Sciences où j'ai rencontré **Marie-Pierre Moisan**. Je vous remercie pour tout le temps que vous m'avez accordé, pour avoir accueilli mes doutes avec bienveillance et avoir su m'apporter des réponses rassurantes. Vos conseils continuent de m'accompagner,

que ce soit à travers le prisme de votre expérience de mère ou votre posture de directrice de recherche.

Finalement, j'aimerais remercier du fond du cœur tous mes amis et ma famille qui m'ont soutenue durant cette période aussi belle que compliquée :

Merci à la coloc du feu de bois dans laquelle j'ai tout de suite trouvé ma place ! Merci à **Charlux, PH** et **Margal** de m'avoir fait me sentir chez moi dès le début, et pour toute leur patience à mon égard (je sais bien que, à mon grand regret, je suis loin d'être parfaite...). Merci pour ces dîners remplis de rires, de complicité, de joie et de chansons à la guitare. Merci aussi d'avoir accueilli mes moments de doute et d'avoir écouté mes plaintes sans jugement. Vous avez une place toute particulière dans mon cœur.

À mes amis du G4, qui ont pris une place immense dans ma vie au fil des années. Merci à **Charline, Chloé, Léa, Lisa, Clément LG., Titouan, Antoine, Jérémy, Tytouan** et **Clément D.** pour votre amitié fidèle, qui tient bon depuis toutes ces années, peu importe les hauts, les bas, et surtout, les kilomètres. Voilà maintenant sept ans que l'on cultive cette relation unique et tellement précieuse. Je suis infiniment reconnaissante de faire partie de vos vies. Vous m'avez accompagnée dès les débuts de cette thèse, et aujourd'hui, alors qu'elle touche à sa fin, il est profondément symbolique pour moi de graver vos noms ici, pour toujours, dans ces pages.

J'ai une pensée particulière pour **Étienne**, qui a tenu une place précieuse dans ma vie et dans mon cœur au cours de cette dernière année de thèse. Notre rencontre a véritablement bouleversé mon quotidien. Merci pour ton soutien sans faille, ton amour si fort, ta joie et ta bonne humeur contagieuse. Merci de croire en moi, souvent bien plus que je ne le fais moi-même, de m'encourager à aller de l'avant et, surtout, de m'aider à faire des choix (promis, je vais vraiment travailler là-dessus).

Merci à **Tata Fanou, Damien, Jules, Lou** et **Apolline**. Merci pour vos petits mots, vos encouragements et votre soutien !

Merci à mes grands-parents, **Manou** et **Padou**, pour m'avoir toujours encouragée à donner le meilleur de moi-même, aussi bien physiquement que dans mes études. Votre amour, votre confiance et votre soutien ont été un pilier précieux tout au long de ces trois années. Merci **Oma**, d'être une grand-mère haute en couleurs, des cheveux jusqu'aux bout des ongles.

J'espère avoir hérité de ta lumière et de ta fantaisie. Merci **Papé** de veiller sur moi.

Merci **Maman**, merci **Papa**, d'avoir toujours été là pour moi, à chaque étape de cette aventure (et depuis 27 ans déjà). Merci pour votre soutien constant, pour avoir écouté mes plaintes, essuyé mes larmes et simplement été présent quand j'en avais besoin. Je sais que j'ai parfois du mal à exprimer ce qui ne va pas. Merci d'avoir respecté mes silences et de m'avoir donné tout votre amour.

Finalement, je tenais à offrir mes derniers remerciements à ma petite sœur, ma meilleure amie. Alors, merci **Aure**. Merci d'être un rayon de soleil et de me faire rire depuis si longtemps (ah non, tu ne vas pas encore faire tomber ta tétine comme hier !). Merci d'être une sœur aussi extraordinaire.

J'espère de tout cœur que ce travail saura vous rendre fiers.

Liste des principales abréviations

A

ACC : American College of Cardiology

ACTP : Angioplastie Coronaire Transluminale Percutanée

ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

AH : Acide Hyaluronique

AHA : American Heart Association

ANSM : l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé

ARA II : Antagonistes des Récepteurs de l'Angiotensine

ARMM : Microvésicules médiées par ARRDC1

ARN : Acide Ribonucléique

α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin

B

BPF : Bonne Pratique de Fabrication

C

CSE : Cellules Souches Embryonnaires

CSM : Cellule Stromale Mésenchymateuse

D

DLP : Digital Light Processing

DxS : Sulfate de Dextran

E

EBB : Bio-impression par Extrusion

ERI : Etablissement Rongeur INSERM

ESC : European Society of Cardiology

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

F

FBS : Sérum de Veau Foetal

FDA : Food and Drug Administration

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

G

G' : Module de stockage

G'' : Module de perte

H

HCF : Fibroblaste Cardiaque Humain

HUVEC : Cellule Endothéliale de la Veine Ombilicale Humaine

I

IC : Insuffisance Cardiaque

ICC : Immunocytochimie

IEC : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion

IFN γ : Interféron gamma

IL-1 : Interleukine 1

IL-10 : Interleukine 10

ILV : Vésicule Intraluminale

IM : Infarctus du Myocarde

iMSC : Cellule Stromale Mésoenchymateuse dérivée d'iPSC

iPSC : Cellule Pluripotente Induite

IR : Ischémie-Reperfusion

ISEV : International Society of Extracellular Vesicles

L

LAB : Bio-impression Assistée par Laser

L-asc : L-ascorbique 2-phosphate

LPS : Lipopolysaccharide

LVR : Région Viscoélastique Linéaire

M

MC : Milieu Complet

MD : Milieu de Déprivation

mdMSC : Cellules Stromales Mésoenchymateuse dérivée de muscle

MEC : Matrice Extracellulaire

MISEV : Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles

MLR : Réaction Lymphocytaire Mixte

MMP : Métalloprotéases Matricielles

MNC : Cellules Mononucléées

MP : Milieu Pauvre

MS : Milieu de Stimulation

MVB : Corps Multivésiculaires

N

NTA : Nanoparticle Tracking Analysis

NGB : Next Generation Bioprinter

P

PBMC : Cellule Mononucléée Sanguine Périphérique

PCL : Polycaprolactone

PEG : Polyéthylène Glycol

PFA : Paraformaldehyde

PLGA : Poly (acide lactique-co-glycolique)

PPI : Pour Préparation Injectable

Q

q-PCR : Amplification en Chaîne par Polymérase quantitative

R

RECA-1 : Rat Endothelial Cell Antigen-1

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

S

SLA : Bio-impression par stéréolithographie

T

TA : Température Ambiante

TNF α : Facteur de Nécrose Tumoral alpha

TPP : Target Product Profil

V

VE : Vésicule Extracellulaire

VEGF : Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire

VES : Volume d'Ejection Systolique

VTD : Volume Télédiastolique

VTS : Volume Télésystolique

Résumé en français

Titre : Utilisation de la bio-impression pour développer un patch cardiaque de grade clinique

Résumé :

L'insuffisance cardiaque (IC) consécutive à un infarctus du myocarde (IM) demeure un enjeu clinique majeur, nécessitant le développement de stratégies thérapeutiques innovantes. Parmi elles, la thérapie cellulaire suscite un intérêt croissant. Initialement envisagée comme une approche de remplacement cellulaire, son efficacité repose en réalité sur des mécanismes paracrines, majoritairement médiés par les vésicules extracellulaires (VE). L'un des principaux défis reste le mode d'administration, qui doit être simple, reproductible et permettre une exposition ciblée et prolongée du myocarde au traitement.

Cette thèse a pour objectif de comparer le potentiel thérapeutique de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) humaines et de leurs VE, issues de deux origines distinctes : des CSM dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iMSC) et des CSM dérivées de muscle squelettique humain (mdMSC). Ces deux sources alternatives présentent l'avantage d'être plus accessibles et de générer une variabilité inter-lots réduite, critère essentiel pour une application clinique.

Après un criblage comparatif *in vitro*, le candidat le plus prometteur a été intégré dans un patch de collagène bio-imprimé de grade clinique, développé en collaboration avec l'entreprise Poietis. Ce patch a été conçu pour une administration chirurgicale, en supposant que le biomatériau permettrait de protéger les cellules ou les VE et d'en prolonger la libération locale. La bio-impression 3D a permis de produire des patchs standardisés, reproductibles et conformes aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Les différents candidats ont été évalués *in vitro* pour leurs propriétés pro-angiogéniques et anti-apoptotiques. Les VE, quelle que soit leur origine, n'ont pas montré d'effet significatif. Les mdCSM se sont révélées efficaces et surtout plus sûres que leurs homologues dérivés des cellules souches pluripotentes et elles ont donc été sélectionnées pour la suite des travaux. Leur potentiel anti-fibrotique et immunomodulateur a ensuite été confirmé *in vitro*. Parallèlement, le patch de collagène a été caractérisé par des tests rhéologiques, montrant un comportement élastique solide compatible avec une implantation sur le myocarde. Les patchs fonctionnalisés avec des mdMSC ont enfin été testés *in vivo* dans un modèle de dysfonction

ventriculaire gauche induite par ischémie-reperfusion chez le rat. Les animaux ainsi traités ont montré une amélioration significative de leur fonction cardiaque, contrairement au groupe témoin (sham). L'analyse transcriptomique des tissus cardiaques a révélé une réduction de l'expression de gènes associés à la fibrose, à l'inflammation et à l'apoptose, en cohérence avec l'amélioration fonctionnelle observée.

En résumé, ces travaux mettent en évidence le potentiel thérapeutique des mdMSC intégrées dans un patch de collagène bio-imprimé pour le traitement de l'IC chronique. Cette approche apparaît prometteuse pour limiter les lésions myocardiques et moduler favorablement le remodelage cardiaque, ouvrant la voie à une stratégie de médecine réparatrice transposable en clinique.

Mots-clés :

Insuffisance cardiaque, Thérapie cellulaire, Cellules stromales mésenchymateuses, Vésicules extracellulaires, Biomatériau, Collagène, Bio-impression

Résumé en anglais

Title : Using bioprinting to develop a clinical-grade cardiac patch

Resume :

Heart failure (HF) following myocardial infarction (MI) remains a major clinical challenge and requires the development of innovative therapeutic strategies. Among these, cell therapy has shown promise. Initially believed to act through cell engraftment and regeneration, its effects are now largely attributed to paracrine mechanisms, mainly mediated by extracellular vesicles (EV). However, the route of administration remains a critical limitation. In a clinical setting, delivery must be simple, reproducible, and allow optimal exposure of the damaged myocardium to the therapeutic agent.

This thesis aimed to compare the respective therapeutic potential of human mesenchymal stromal cells (MSC) and their EV, derived from two distinct sources: induced pluripotent stem cell-derived MSC (iMSC) and muscle-derived MSC (mdMSC). These alternative sources offer improved accessibility and reduced inter-batch variability, which are key advantages for clinical translation.

After comparative in vitro screening, the most promising therapeutic agent was incorporated into a clinical-grade 3D-bioprinted collagen patch, developed in collaboration with the company Poietis. The patch was designed to allow a surgical mode of administration, hypothesizing that the biomaterial would protect cells or EVs and prolong their local release. The 3D bioprinting process enabled the creation of standardized and reproducible patches under conditions compatible with Good Manufacturing Practices (GMP).

All candidates were first evaluated in vitro for angiogenic and anti-apoptotic properties. While EVs from both sources showed limited effects, mdMSC were found both effective and safer than their iPSC-derived counterparts and they were then selected for further analysis. Their anti-fibrotic and immunomodulatory properties were subsequently confirmed. In parallel, the collagen patch was rheologically characterized, demonstrating solid-like elastic behavior appropriate for myocardial application. The mdMSC-functionalized patches were finally evaluated in a rat model of ischemia-reperfusion-induced left ventricular dysfunction. Treated animals showed improved cardiac function, in contrast to sham-operated controls. Transcriptomic analyses of cardiac tissue revealed reduced expression of genes involved in

fibrosis, inflammation, and apoptosis in the treated group, supporting the observed functional improvement.

These results demonstrate the therapeutic potential of mdMSC embedded in a 3D-bioprinted collagen patch for the treatment of chronic HF. This strategy appears to limit myocardial injury and positively modulate cardiac remodeling, paving the way for a reparative medicine strategy translatable to clinical application.

Keywords :

Heart failure, Cell therapy, Mesenchymal stromal cells, Extracellular Vesicles, Biomaterial, Collagen, Bioprinting

Index des figures

Figure 1 : Principaux symptômes de l'insuffisance cardiaque	29
Figure 2 : Classification de l'IC de l'ACC/AHA (présence d'anomalies structurelles et facteurs de risque) et de la NYHA (sévérité des symptômes et activité physique) adapté de Delahaye, 2013 (5)	30
Figure 3 : Les 10 principales causes de mortalité dans les pays à revenus élevé (6)	31
Figure 4 : Schéma de l'infarctus du myocarde causé par l'obstruction de l'artère coronaire gauche	32
Figure 5 : Physiopathologie du remodelage du ventricule gauche après un infarctus du myocarde. Adapté	33
Figure 6 : Exemple d'une stratégie thérapeutique phasée après infarctus du myocarde	36
Figure 7 : Vue d'ensemble des approches de régénération cardiaque adaptée de Garbern and Lee, 2022 (19).....	37
Figure 8 : Types de vésicules extracellulaires différenciées selon leur taille et leur origine. Adapté de Kang et al., 2021 (62).....	44
Figure 9 : Biogénèse des exosomes. Adapté de Fag et al., 2024 (65) et de Gioseffi et al., 2021 (66).....	46
Figure 10 : Réorganisation de l'actine et du cytosquelette et libération des MV. Adapté de Oggero et al., 2019 (68)	47
Figure 11 : La formation et la libération des corps apoptotiques. Adapté de Han et al., 2024 (72)	48
Figure 12 : Biogénèse des migrasomes en trois phases. Adapté de Jiao and Yu, 2024 (74)	50
Figure 13 : Biogénèse des larges oncosomes. Tiré de Ozkocak et al., 2022 (79)	51
Figure 14 : Composition moléculaire globale des vésicules extracellulaires. Tiré de Shahraki et al., 2023 (83)	52
Figure 15 : La voie et le devenir des VE après l'internalisation. Adapté de Fang et al., 2024 (65)	53
Figure 16 : Exemples de facteurs pouvant avoir un impact sur l'effet thérapeutique des VE.	

Adapté de Xia et al., 2024 (92)	55
Figure 17 : Modes d'administration des cellules ou des VE au cœur. Adapté de Duan, 2020 (105)	56
Figure 18 : Schéma de la bio-impression à base de jet d'encre (A : chauffage ; B : actionneur piézoélectrique). Adapté de Pu et al., 2024 (115).....	59
Figure 19 : Principes de la bio-impression par extrusion. Adapté de Pu et al., 2024 (115).....	61
Figure 20 : Principe de la bio-impression assistée par laser. Adapté de Pu et al., 2024 (115) .	63
Figure 21 : Principe de la bio-impression par stéréolithographie classique et Digital Light Processing (DLP). Adapté de Pu et al., 2024 (115).....	64
Figure 22 : Schéma explicatif du fonctionnement du NTA adaptée de Filipe et al., 2010 (161)	78
Figure 23 : Schéma explicatif du protocole du MACSPlex Exosome Kit pour caractériser les VE	79
Figure 24 : Schéma explicatif de l'utilisation des inserts de culture (Ibidi).....	80
Figure 25 : Principe du kit CCK-8 pour mesurer la viabilité cellulaire	82
Figure 26 : Schéma du protocole de culture cellulaire du test de modulation de la fibrose ...	84
Figure 27 : Schéma du protocole d'ajustement de la formulation de collagène.....	88
Figure 28 : Bio-imprimante 3D Pi3 (gauche) et vue de l'intérieur des différents modules (droite)	89
Figure 29 : Papier d'ancrage placé dans une plaque à puits unique.....	89
Figure 30 : Photo prise au microscope d'un patch bio-imprimé fonctionnalisé avec les mdMSC	90
Figure 31 : Protocole expérimental pour l'évaluation in vivo des patchs cardiaques fonctionnalisés par les mdMSC	93
Figure 32 : Photo de la ligature temporaire de l'artère coronaire gauche.....	94
Figure 33 : Photo du TachoSil avant (gauche) et après implantation sur le myocarde (droite) pour maintenir le patch sur la zone infarctée.	95
Figure 34 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface des iMSC à P0 (en violet :	

la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif)	101
Figure 35 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface des iMSC à P3 (en violet : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif)	102
Figure 36 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des facteurs de transcription Nanog, Sox2 et Oct3/4 des iMSC (en violet : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif). (A) iMSC à passage 0. (B) iMSC à passage 5.....	103
Figure 37 : Photos des iMSC non différenciées et après différenciation en trois types cellulaires : adipocytes, chondrocytes et ostéocytes	104
Figure 38 : Pourcentage de prolifération de lymphocytes T (CD3+) en présence de iMSC avec ou sans activation à l'IFN γ avec différents rapports (n=1).	105
Figure 39 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface des mdMSC à P5 (en bleu : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif).....	106
Figure 40 : Photos des mdMSC non différenciées et après différenciation en trois types cellulaires : adipocytes, chondrocytes et ostéocytes	107
Figure 41 : Pourcentage de prolifération de lymphocytes T (CD3+) en présence de mdMSC avec ou sans activation à l'IFN γ avec différents rapports (n=1).	108
Figure 42 : Marqueurs de surface des VE de CSM analysés par cytométrie en flux	109
Figure 43 : Analyse par NTA de la distribution des VE en fonction de leur concentration et de leur taille. (A) VE dérivées de mdMSC. (B) VE dérivées de iMSC. (C) Image des VE obtenues lors de l'analyse au NTA.....	110
Figure 44 : Evaluation du potentiel pro-angiogénique des CSM (gauche) et des VE (droite) par test de cicatrisation (A) p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Dunnett. (B) Photos des HUVEC à T0 et à T+24h après incubation des iMSC et des mdMSC	111
Figure 45 : Evaluation du potentiel anti-apoptotique des CSM (gauche) et des VE (droite) par test de viabilité p value $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****) Kruskal-Wallis test avec correction par le test multiple de Dunnett	112
Figure 46 : Critères de sélection de l'agent thérapeutique selon 3 critères	113

Figure 47 : Immunomarquage des fibroblastes cardiaques humains (HCF) pour détecter α -SMA (vert), les membranes cellulaire (rouge) et les noyaux (bleu). p value : $\leq 0,05(*)$, $\leq 0,01(**)$ Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Dunnett (n=2).....	114
Figure 48 : Analyse de l'expression des gènes par qPCR impliqués dans la fibrose et le remodelage cardiaque par des fibroblastes cardiaques humains (HCF). p value : $\leq 0,05(*)$, $\leq 0,01(**)$, $\leq 0,001(***)$, $\leq 0,0001(****)$ Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey (n=3).	115
Figure 49 : Analyse de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF α (n=4) et anti-inflammatoires IL-10 (n=3) dans le surnageant de culture de monocytes humains (THP-1). p value : $\leq 0,05(*)$, $\leq 0,01(**)$ Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Dunnett.	116
Figure 50 : Test d'oscillation en amplitude (fréquence = 1Hz) du collagène bio-imprimé fonctionnalisé ou non par des mdMSC.....	117
Figure 51 : Test d'oscillation en fréquence (contrainte = 0,5%) du collagène bio-imprimé fonctionnalisé ou non par des mdMSC.....	118
Figure 52 : Analyse par cytométrie en flux de la viabilité des mdMSC 3 jours après extrusion (en bleu : la population d'intérêt, en vert : le contrôle positif Live, en orange : le contrôle positif Dead, en rose : le contrôle négatif).....	118
Figure 53 : Evaluation du potentiel pro-angiogénique des mdMSC 24h après extrusion et extraction du collagène. (A) Histogramme de la recolonisation de la cicatrice après 24h. (B) Photos des HUVEC à T0 et à T+24h après incubation des mdMSC	119
Figure 54 : Mesures de l'évolution (A) de l'épaisseur et (B) du poids des patches de collagène de 0,8cm ² et de 2cm dans le temps.....	120
Figure 55 : Analyse par cytométrie en flux de la viabilité des mdMSC après extrusion et congélation (en bleu : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif Live, en orange : le contrôle positif Dead, en rose: le contrôle négatif). (A) T0 après décongélation. (B) T24 après décongélation	121
Figure 56 : Trajectoires individuelles de la FEGV des mesures de base (avant traitement) aux mesures finales (après traitement) des trois groupes d'animaux. p value : $\leq 0,05(*)$ Repeated measures two-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey.	122

Figure 57 : Evolution des volumes ventriculaires gauches (B) VTS et (C) VTD permettant de calculer la (A) FEVG et le (D) VES. p value : $\leq 0,05(*)$, $\leq 0,01(**)$ - (A) Kruskal-Wallis test avec correction par le test multiple de Dunnett, (B-C) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey, (D) Repeated measures two-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey.....	123
Figure 58 : Analyse de la taille de la cicatrice sur les coupes des cœurs infarcis. (A) Image de la coloration au trichrome de Masson (barre d'échelle = 2mm). (B) Histogramme de la taille de la cicatrice en fonction des groupes de traitement. (C) Courbe de corrélation entre la taille de la cicatrice et la FEVG. p value : $\leq 0,05(*)$, $\leq 0,01(**)$ Corrélation de Pearson.	125
Figure 59 : Quantification du collagène interstitiel sur les coupes des cœurs infarcis. (A) Image de la coloration au rouge Sirius (gauche) et de l'analyse par le logiciel FIBER (droit). (B) Histogramme de la quantification du collagène interstitiel en fonction des groupes de traitement.....	126
Figure 60 : Analyse de la taille de l'angiogenèse sur les coupes des cœurs infarcis. (A) Image de l'immunomarquage de l'antigène de surface RECA-1 (gauche) et de l'analyse par le logiciel FIBER (droit). (C) Histogramme de l'angiogenèse en fonction des groupes de traitement. ...	127
Figure 61 : Analyse de l'expression de gènes impliqué dans l'insuffisance cardiaque (DDAH1, NPPB), l'apoptose (ERRFI1), l'inflammation (CXCL11, CXCL9, LY6C, PTGS2), la fibrose (FN1, PLOD2, COL1A1, COL3A1) et le remodelage cardiaque (POSTN, THBS1) par RT-qPCR dans les groupes sham, patch et patch+mdMSC comprenant respectivement 8, 7 et 9 animaux. p value $\leq 0,05(*)$ Kruskal-Wallis test avec correction par le test multiple de Dunnett.....	129

Index des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des principaux paramètres des techniques courantes de bio-impression.....	66
Tableau 2 : Liste des amorces humaines pour les qPCR	85
Tableau 3 : Profil cible de produit du patch cardiaque.....	87
Tableau 4 : Formule de calcul des volumes des réactifs de la bio-encre de collagène	88
Tableau 5 : Liste des amorces rats pour les qPCR.....	99
Tableau 6 : Mesure de la taille d'effet par l'indice d de Cohen des groupes de rats traités (patch et patch+mdMSC) versus non traités (sham)	124

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des principales abréviations.....	11
Résumé en français	16
Résumé en anglais	18
Index des figures	20
Index des tableaux.....	25
Table des matières	26
Introduction	29
1. L'insuffisance cardiaque.....	29
1.1. Définition et symptômes	29
1.2. Épidémiologie de l'insuffisance cardiaque	30
2. L'infarctus du myocarde	31
2.1. Le remodelage cardiaque.....	33
3. Les traitements et les axes de recherche	35
3.1. Thérapies recommandées.....	35
3.2. La thérapie cellulaire	37
3.3. Les types cellulaires	37
3.4. La thérapie acellulaire	42
3.5. Les modes d'administration	55
4. Techniques de bio-impression 3D	58
4.1. Les types d'impression	58
4.2. Les types de biomatériaux pour la bio-impression de patches cardiaques.....	66
4.3. Considérations sur la conception des biomatériaux pour la bio-impression de patches cardiaques	70
4.4. Recommandations pour avoir un produit bio-imprimé de grade clinique	72
5. Présentation du projet de thèse.....	73

Matériel & Méthodes.....	75
1. Production des CSM et des VE	75
1.1. Expansion des CSM dérivées d'iPSC	75
1.2. Expansion des CSM de muscle squelettique humain	75
1.3. Caractérisation des CSM	76
1.4. Production et isolement des VE	77
1.5. Tests d'évaluation du potentiel thérapeutique <i>in vitro</i>	79
2. Design et fabrication du patch cardiaque de grade clinique.....	86
2.1. Cahier des charges du patch cardiaque	86
2.2. Impression et fonctionnalisation du patch cardiaque par les CSM	87
2.3. Caractérisation rhéologique du patch cardiaque	91
2.4. Caractérisation des CSM incorporées dans le patch cardiaque.....	91
2.5. Stabilité du patch cardiaque.....	92
2.6. Congélation des patches cardiaques	92
3. Evaluation <i>in vivo</i> des patches cardiaques fonctionnalisés par les mdMSC dans un modèle de dysfonction ventriculaire gauche chez le rat	92
3.1. Considérations éthiques et modèle animal	93
3.2. Procédures chirurgicales	94
3.3. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie	96
3.4. Analyses histologiques	97
3.5. Analyses transcriptomiques	98
3.6. Analyses statistiques	99
Résultats	101
4. Production des VE et des CSM	101
4.1. Caractérisation des CSM	101
4.2. Caractérisation des VE.....	108
4.3. Tests d'évaluation du potentiel thérapeutique <i>in vitro</i>	110

5. Choix de l'agent thérapeutique.....	112
5.1. Test de modulation de la fibrose	113
5.2. Test de modulation de l'inflammation	115
6. Caractérisation du patch cardiaque fonctionnalisé par les mdMSC	116
6.1. Propriétés mécaniques et rhéologiques	116
6.2. Caractéristiques des mdMSC incorporées dans le patch cardiaque	118
6.3. Stabilité et stockage du patch cardiaque	119
7. Evaluation <i>in vivo</i> du patch cardiaque	121
7.1. Evaluation de la fonction cardiaque	122
7.2. Analyses histologiques	124
7.3. Analyses transcriptomiques	128
Discussion.....	130
1. Rationnel de l'étude	130
2. Caractérisation et effets thérapeutiques des CSM et des VE <i>in vitro</i>	132
3. Utilisation de la bio-impression 3D et choix du biomatériau	133
4. Effets thérapeutiques du patch cardiaque fonctionnalisé dans un modèle <i>in vivo</i>	135
5. Limitations	137
6. Les défis de la translation clinique des patchs cardiaques bio-imprimés	138
Conclusion & Perspectives.....	141
1. Conclusion générale	141
2. Perspectives	141
Références	143
Article en cours de soumission.....	160

Introduction

1. L'insuffisance cardiaque

1.1. Définition et symptômes

Les recommandations des sociétés savantes de cardiologie européenne (European Society of Cardiology, ESC) et américaine (American Heart Association, AHA et American College of Cardiology, ACC) visent à standardiser la définition de l'insuffisance cardiaque. Les directives européennes la définissent comme une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur empêchant une délivrance suffisante d'oxygène aux tissus, malgré des pressions de remplissage normales ou augmentées. Les recommandations américaines, quant à elles, la qualifient de syndrome clinique complexe résultant d'altérations qui limitent la capacité du ventricule à se remplir ou à éjecter du sang, entraînant ainsi une restriction de l'activité physique (1). Par ailleurs, elles s'accordent sur les manifestations cliniques caractéristiques de ce syndrome, notamment la dyspnée, la fatigue, ainsi que la présence d'œdèmes périphériques et pulmonaires associés à une rétention hydrosodée (2,3). Les principaux symptômes sont schématisés dans la Figure 1.

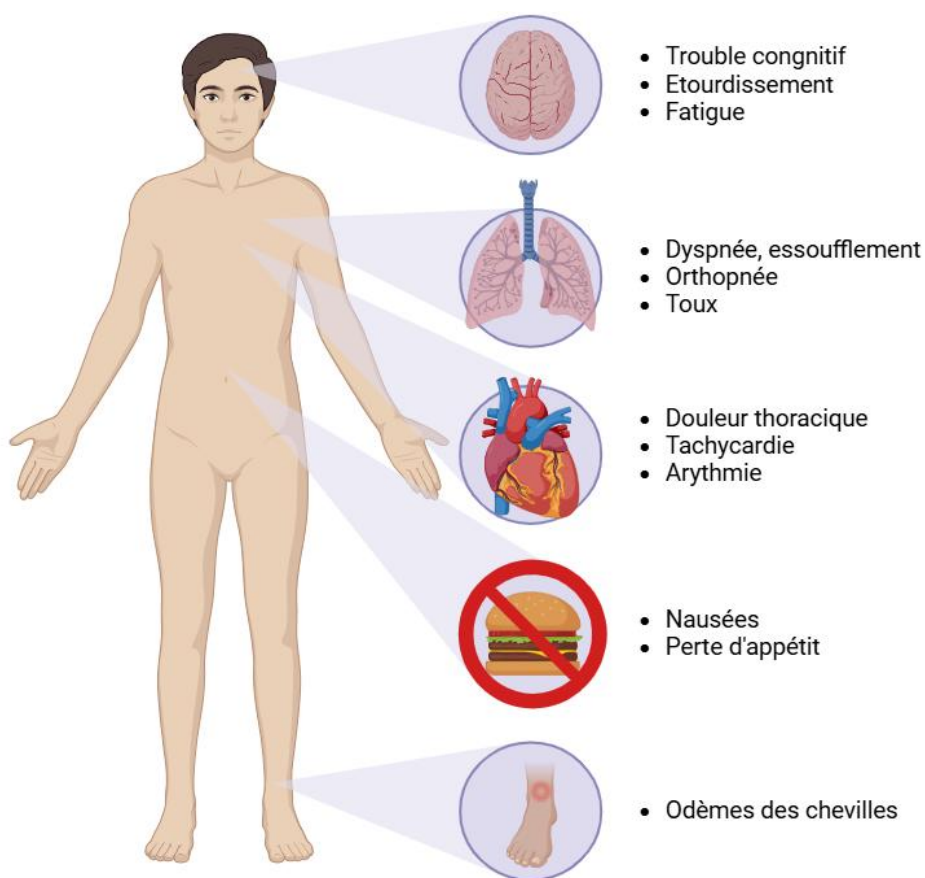


Figure 1 : Principaux symptômes de l'insuffisance cardiaque

L'AHA, l'ACC ainsi que la New York Heart Association (NYHA) ont conjointement mis au point une classification utilisée pour grader le risque d'IC et la gravité des symptômes, basée sur le degré d'effort physique nécessaire pour les observer. (4).

ACC/AHA		NYHA	
Stade	Risque	Stade	Fonction
A	Patients à risque élevé de développer une insuffisance cardiaque (par exemple, en présence d'hypertension, de coronaropathie, de diabète ou d'antécédents familiaux de cardiomyopathie), mais sans maladie cardiaque structurelle ni symptômes d'insuffisance cardiaque.	I	Aucune limitation de l'activité physique. Les patients n'éprouvent aucune gêne lors d'activités physiques ordinaires.
B	Patients présentant une maladie cardiaque structurelle (telle qu'une dysfonction systolique du ventricule gauche ou un antécédent d'infarctus du myocarde) mais sans symptômes cliniques d'insuffisance cardiaque.	II	Légère limitation de l'activité physique. Les patients sont confortables au repos, mais une activité physique ordinaire provoque une fatigue, une dyspnée ou des palpitations.
C	Patients avec une maladie cardiaque structurelle qui présentent actuellement ou ont présenté par le passé des symptômes d'insuffisance cardiaque (par exemple, dyspnée, fatigue, tolérance réduite à l'effort).	III	Limitation marquée de l'activité physique. Les patients sont à l'aise au repos, mais moins que l'activité ordinaire entraîne des symptômes.
D	Patients atteints d'insuffisance cardiaque avancée et réfractaire aux traitements conventionnels, nécessitant des interventions spécialisées (telles que l'assistance ventriculaire ou la transplantation cardiaque).	IV	Incapacité d'exercer une activité physique sans inconfort. Les symptômes de l'insuffisance cardiaque sont présents au repos et s'aggravent avec toute activité.

Figure 2 : Classification de l'IC de l'ACC/AHA (présence d'anomalies structurelles et facteurs de risque) et de la NYHA (sévérité des symptômes et activité physique) adapté de Delahaye, 2013 (5)

La classification proposée par l'ACC et l'AHA se distingue par l'impossibilité pour les patients atteint d'IC de revenir à un stade inférieur. En revanche, la classification symptomatique établie par la NYHA permet une évolution rapide des patients, qui peuvent passer en un court laps de temps du stade I au stade IV, ou inversement. Ainsi, tandis qu'il est exceptionnel de voir des patients passer du stade D au stade B dans la classification ACC/AHA, la classification de la NYHA permet des évolutions rapides, avec des transitions possibles entre des stades très différents (3,4).

1.2. Épidémiologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC est souvent la conséquence finale des cardiopathies ischémiques qui restent la première cause de mortalité dans le monde (Figure 3). En 2019, on estime à 17,9 millions le nombre de décès attribuables aux maladies cardio-vasculaires, soit 32% de la mortalité mondiale totale.



Figure 3 : Les 10 principales causes de mortalité dans les pays à revenus élevé (6)

Parmi ces décès, 85 % étaient dus aux infarctus du myocarde (IM) ou aux accidents vasculaires cérébraux (6,7).

2. L'infarctus du myocarde

En France, environ 80 000 IM sont recensés chaque année, avec près de 10 % des patients décédant dans l'heure suivant l'événement et un taux de mortalité à un an de 15 %. Les avancées thérapeutiques, la rapidité d'intervention et la disponibilité accrue d'unités de cardiologie interventionnelle ont permis de réduire le taux de mortalité à 30 jours, passant de 10,2 % en 1995 à 2,1 % en 2015 (8).

L'amélioration des taux de survie post-infarctus et l'augmentation de l'espérance de vie ont conduit à une hausse du nombre de patients développant une IC. À l'échelle mondiale, on estime qu'en 2020, 64,3 millions de personnes vivaient avec une IC (9) ce qui correspond à

environ 1 à 2 % de la population adulte dans les pays développés. En France, 2,3 % de la population, soit environ 1,5 million de personnes, seraient atteints d'une IC, laquelle est responsable de 70 000 décès par an (10).

L'IM est une lésion irréversible qui résulte de l'obstruction d'une artère coronaire par un caillot sanguin à la suite de la rupture d'une plaque d'athérome essentiellement composée de lipides (Figure 4). Cette obstruction entraîne une ischémie locale et une privation d'oxygène et de nutriments essentiels au myocarde. Ce manque d'apport sanguin provoque une cascade d'événements menant à la dysfonction cellulaire et, finalement, à la mort cellulaire par nécrose et apoptose.

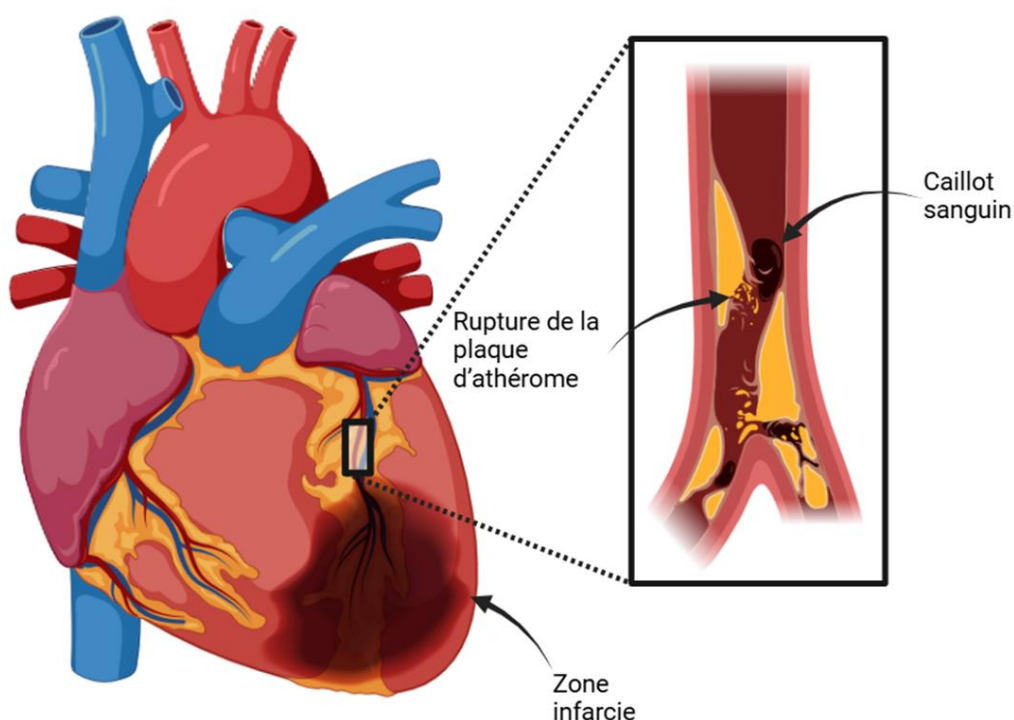


Figure 4 : Schéma de l'infarctus du myocarde causé par l'obstruction de l'artère coronaire gauche

Par la suite, la nécrose du tissu myocardique déclenche une réponse inflammatoire, caractérisée par le recrutement de cellules immunitaires et la libération de cytokines pro-inflammatoires. Cette réaction inflammatoire contribue au processus de remodelage, au cours duquel le tissu nécrosé est progressivement remplacé par du tissu cicatriciel, altérant ainsi la capacité contractile du cœur.

2.1. Le remodelage cardiaque

La réparation du cœur infarci s'accompagne d'une augmentation du volume cardiaque, conséquence d'un remodelage associant à la fois une surcharge de pression et une surcharge de volume. La perte de la fonction contractile d'un segment myocardique entraîne ainsi une dilatation compensatoire du reste du myocarde. Initialement, ce remodelage constitue un mécanisme adaptatif bénéfique permettant au myocarde de faire face aux contraintes imposées par les deux types de surcharge. La cicatrisation de l'infarctus se décompose en trois phases qui se chevauchent, chacune contribuant au processus global de réparation : la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de maturation (Figure 5).

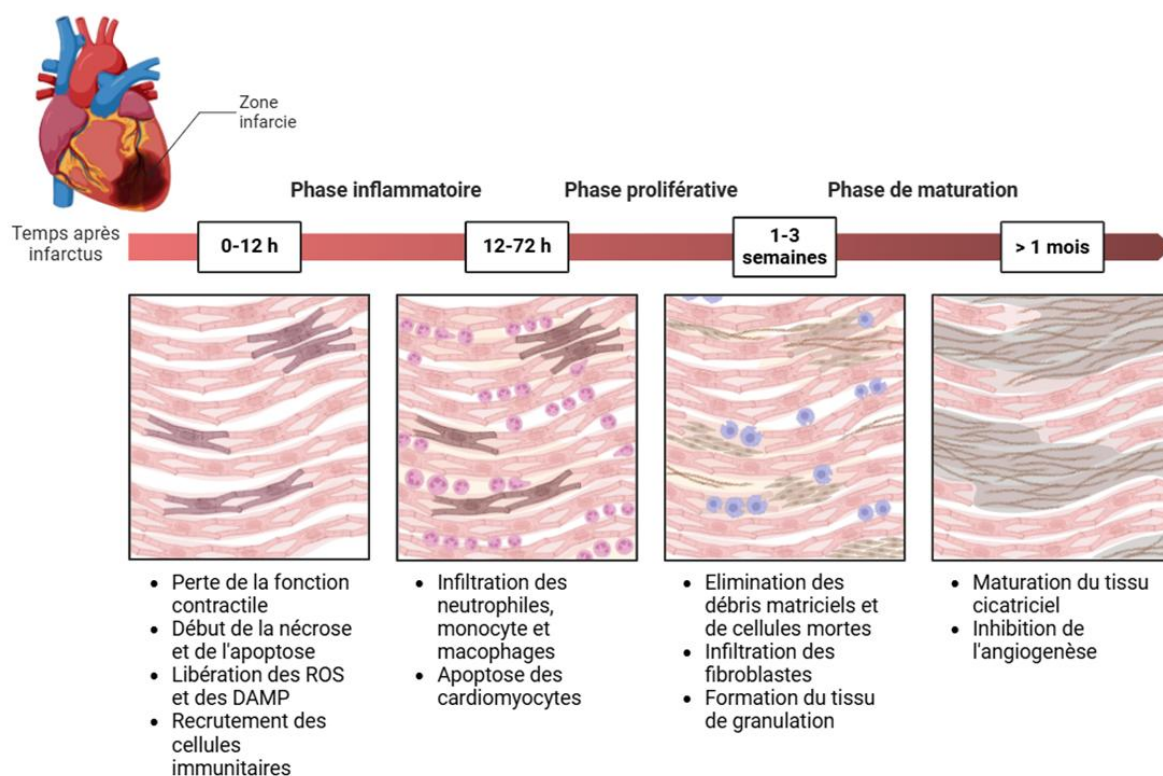


Figure 5 : Physiopathologie du remodelage du ventricule gauche après un infarctus du myocarde. Adapté de Frantz et al., 2022 (11)

2.1.1. Phase inflammatoire

Immédiatement après l'infarctus, la mort des cardiomyocytes déclenche une cascade inflammatoire aiguë. La libération de motifs moléculaires associés aux lésions (DAMP), aussi appelés alarmines, activent le système immunitaire par l'intermédiaire des récepteurs de l'immunité innée et initie la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1) et le Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (11).

Parallèlement, la reperfusion entraîne une production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui aggravent la lésion en oxydant les protéines, en perturbant l'homéostasie calcique et en amplifiant les voies inflammatoires. Les ROS, en endommageant les membranes cellulaires et mitochondriales, contribuent également à la progression de la nécrose et exacerbent l'infiltration leucocytaire. Par la suite, la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par les métalloprotéases matricielles (MMP) libère des fragments protéiques, tels que ceux d'hyaluronane et de fibronectine, qui activent à leur tour les cellules immunitaires (12). Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules immunitaires favorisent l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium, facilitant le recrutement massif de neutrophiles, de monocytes et de macrophages. Les neutrophiles et les monocytes infiltrants, qui se différencient en macrophages, participent à l'élimination des cellules nécrotiques et des débris matriciels et initient une réponse réparatrice, menant à la formation d'un tissu cicatriciel adéquat (13).

Cette phase, bien que cruciale pour la clairance des débris, pose également les bases d'une inflammation intense qui, si elle n'est pas correctement régulée, peut entraîner des dommages supplémentaires et influencer négativement la réparation tissulaire.

2.1.2. Phase de prolifération

L'élimination des cellules mortes et des débris matriciels pendant la phase inflammatoire de la cicatrisation de l'infarctus prépare le terrain pour la phase proliférative de la réparation cardiaque. Cette phase débute par l'infiltration de fibroblastes et de cellules vasculaires au sein du tissu infarcté, en réponse à la diminution progressive des signaux inflammatoires et à l'activation de facteurs de croissance tels que le TGF- β . Sous l'influence de ces signaux, les fibroblastes se transforment en myofibroblastes et acquièrent un phénotype pro-fibrotique, caractérisé par l'expression de l'alpha-smooth muscle actin (α -SMA) et par une augmentation de la synthèse de composants de la MEC, tels que le collagène et la fibronectine, contribuant ainsi activement à la formation du tissu de granulation. Parallèlement, une angiogenèse précoce est amorcée, avec une augmentation de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de ses récepteurs, qui aboutit à la formation de néovaisseaux hyperperméables (14). Bien que ces nouveaux vaisseaux fournissent de l'oxygène et des nutriments aux cellules réparatrices, ils sont initialement immatures et dépourvus de gaine péricytaire, ce qui contribue à leur instabilité.

La formation du tissu de granulation, riche en cellules réparatrices et en médiateurs bioactifs, crée un microenvironnement dynamique qui amorce la réorganisation de la MEC et prépare le terrain pour la cicatrisation définitive.

2.1.3. Phase de maturation

La phase de maturation représente la transition finale vers la stabilisation du tissu cicatriciel et la résolution complète de l'inflammation. Durant cette phase, la MEC provisoire subit un réarrangement majeur, caractérisé par une réticulation progressive par l'action d'enzymes telles que la lysyl-oxydase, qui favorise la réticulation du collagène, renforçant ainsi la solidité et la durabilité de la cicatrice (15). Parallèlement, la production de protéines matricielles spécifiques diminue, et le nombre de myofibroblastes activés décroît considérablement ; ces cellules entrent en quiescence ou en apoptose, ce qui contribue à la cessation de la synthèse de la matrice (14,16). De plus, l'angiogenèse est inhibée, et les vaisseaux immatures, notamment ceux dépourvus de gaine péricytaire, régressent, ce qui permet une réduction de la perméabilité vasculaire et une limitation de l'infiltration leucocytaire persistante (13).

Ces ajustements aboutissent à une cicatrisation structurée et stable, associée à un remodelage géométrique du ventricule. Ce remodelage inclut la dilatation compensatoire des segments non infarctés et l'hypertrophie des tissus viables, assurant ainsi la préservation à long terme de la fonction cardiaque malgré la perte initiale massive de cardiomyocytes.

3. Les traitements et les axes de recherche

3.1. Thérapies recommandées

3.1.1. Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques de l'IM reposent sur une approche multimodale visant à limiter la taille de l'infarctus, prévenir les complications et améliorer le pronostic à long terme. Parmi ces traitements, les antiagrégants plaquettaires, tels que l'aspirine, jouent un rôle clé dans la prévention de la formation de nouveaux caillots. Les anticoagulants, comme l'héparine, sont également utilisés pour réduire le risque thrombotique durant la phase aiguë en empêchant la conversion du fibrinogène en fibrine. Les bêta-bloquants (antagonistes bêta-adrénergiques) sont prescrits afin de diminuer la demande en oxygène du myocarde en ralentissant la fréquence cardiaque et en réduisant la contractilité. Les inhibiteurs de l'enzyme

de conversion (IEC) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA II) contribuent à la réduction du remodelage ventriculaire et à l'amélioration de la fonction cardiaque en diminuant la pression artérielle par vasodilatation. Par ailleurs, les statines sont essentielles pour stabiliser la plaque d'athérosclérose et réduire l'inflammation, contribuant ainsi à la prévention de futurs événements coronariens. D'autres médicaments, tels que les nitrates, sont également utilisés pour améliorer le flux coronaire en dilatant les vaisseaux sanguins, réduisant ainsi la consommation d'oxygène du myocarde (11,17,18).

3.1.2. Traitements interventionnels

Les traitements chirurgicaux de l'IM visent principalement à rétablir une perfusion sanguine en rétablissant la circulation coronaire. La technique la plus couramment utilisée est l'angioplastie coronaire transluminale percutanée (ACTP) dont la généralisation en urgence, le plus vite possible après le début des symptômes, a totalement transformé le pronostic. Cette intervention consiste à dilater les parois de l'artère obstruée à l'aide d'un ballonnet gonflable, introduit directement dans l'artère grâce à un cathéter, afin de restaurer la circulation sanguine. L'ACTP est suivie de la pose d'un stent pour maintenir l'artère dilatée ouverte. Si le délai de mise en œuvre de l'angioplastie dépasse 90 minutes, une thrombolyse pharmacologique est parfois envisagée.

La Figure 6 présente un exemple des temps d'administration des traitements pour un patient diagnostiqué avec un infarctus du myocarde.

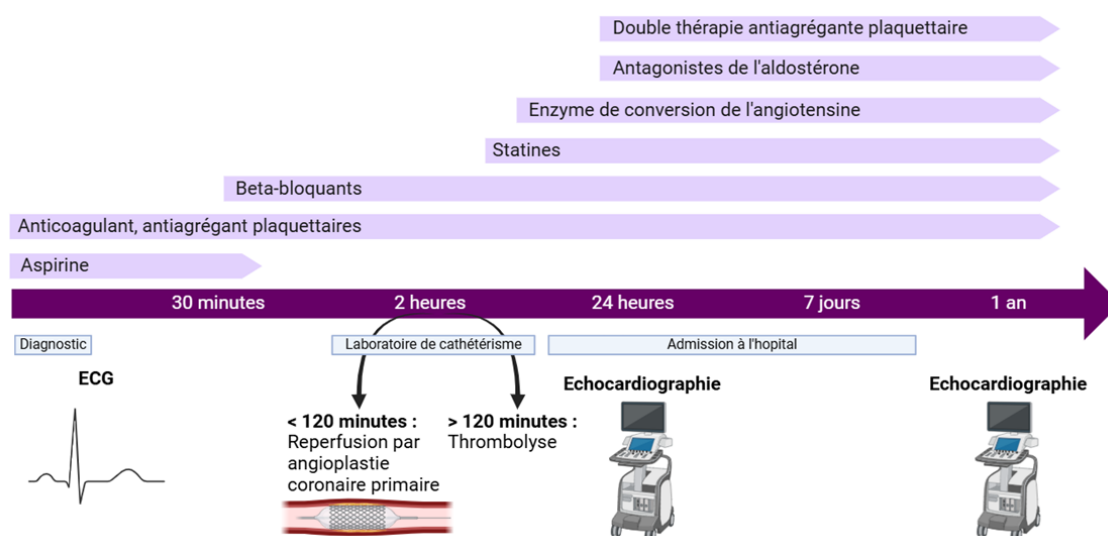


Figure 6 : Exemple d'une stratégie thérapeutique phasée après infarctus du myocarde

3.2. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire représente une approche innovante et prometteuse dans la « régénération » cardiaque, particulièrement après un IM. Face aux limitations des traitements actuels, qui se concentrent essentiellement sur la reperfusion et la prise en charge symptomatique, la thérapie cellulaire vise à restaurer la fonction myocardique en remplaçant les cardiomyocytes perdus. Les principales approches de la thérapie cellulaire cardiaque sont représentées dans la Figure 7.

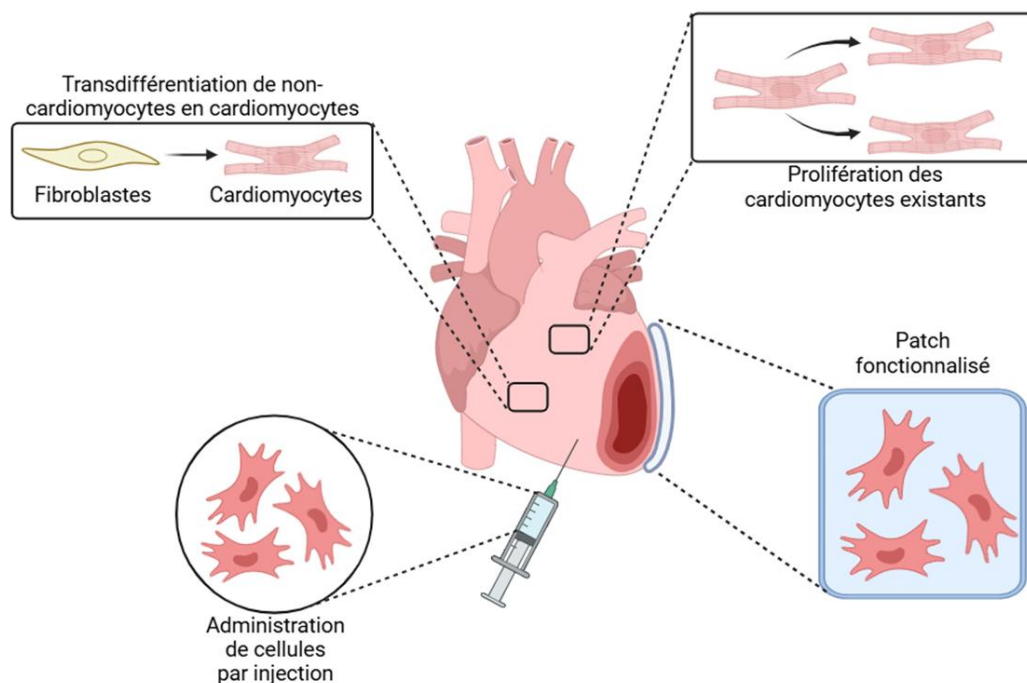


Figure 7 : Vue d'ensemble des approches de régénération cardiaque adaptée de Garbern and Lee, 2022 (19)

3.3. Les types cellulaires

Myoblastes squelettiques

Les myoblastes squelettiques ont été l'un des premiers types cellulaires utilisés en thérapie cellulaire cardiaque. Isolées à partir de cellules satellites, elles présentent l'avantage d'être facilement accessibles via des biopsies autologues, de pouvoir être rapidement cultivée *in vitro* et de résister assez bien aux conditions ischémiques. Des études précliniques, menées sur

divers modèles animaux, ont montré que ces cellules peuvent se différencier en myotubes, réduire la fibrose myocardique, atténuer le remodelage ventriculaire et améliorer la performance cardiaque (20). Forts de ces résultats prometteurs, plusieurs essais cliniques, dont l'essai MAGIC (NCT00102128) (21), ont évalué l'injection intramyocardique de myoblastes squelettiques. Les études randomisées ont échoué à démontrer des bénéfices significatifs et ont mis en évidence un risque accru d'arythmies. Ce risque, principalement attribué à un défaut de couplage électromécanique entre les myoblastes greffés et les cardiomyocytes de l'hôte, a limité l'usage clinique de cette approche (22).

Cellules souches dérivées de la moelle osseuse

Les cellules dérivées de la moelle osseuse ont été le deuxième type cellulaire non cardiaque à être introduit en clinique. Leur utilisation s'est appuyée sur des considérations pratiques, telles que leur disponibilité facile, l'absence de procédés complexes de traitement et un coût relativement bas. En 2001, le premier patient a été traité par injection intracoronaire de cellules mononucléées (MNC) issues de la moelle osseuse (23). Les premiers essais cliniques, même s'ils ont rapporté des améliorations de la contractilité locale et une réduction de la taille de l'infarctus, n'ont pas eu d'effet significatif sur la fonction globale du ventricule gauche ou le devenir clinique des patients. Cette source cellulaire est aujourd'hui abandonnée. Son manque d'efficacité pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité importante de ces cellules, sachant que plus de 99,9 % des MNC ne répondent pas à la définition de cellules « souches », mais sont engagées dans la lignée hématopoïétique à divers stades de maturation (22).

Par la suite, des stratégies visant à enrichir spécifiquement certaines populations, telles que les cellules CD34+ ont été explorées. Créditées d'effets principalement angiogéniques, elles ont donné des résultats positifs chez des patients présentant un angor réfractaire (24,25) et ont plus récemment fait l'objet d'un essai dans l'IM dont les résultats ne sont pas encore connus. Alors que les essais avec des progéniteurs hématopoïétiques purifiés ont donné des résultats contradictoires, plusieurs essais cliniques utilisant les CSM ont montré un potentiel thérapeutique plus prometteur, notamment grâce à leurs effets paracrines angiogéniques, anti-inflammatoires et immunomodulateurs (26–28).

Cellules souches et progénitrices cardiaques

Nous n'insisterons pas sur les cellules c-kit+ initialement décrites comme capables de donner naissance à des cardiomyocytes mais dont on sait aujourd'hui qu'elles étaient promues par des études frauduleuses. Au mieux, ces cellules peuvent donner naissance à des cellules vasculaires (29). L'autre source de cellules souches cardiaques issues de tissus adultes est représentée par les cellules issues de cardiosphères, agrégats de cellules prélevées par une biopsie du ventricule droit et dont le phénotype indique qu'elles sont essentiellement de nature stromale, en dépit de leur attribution de propriétés cardiopoïétiques. Après une étude de phase II encourageante (CADUCEUS) (30), les espoirs n'ont pas été confirmés par un essai de phase III (CHART-1) (31) où l'administration endo-myocardique se faisait par un cathéter (32) et la compagnie qui les développe s'est aujourd'hui recentrée sur leur utilisation par voie systémique dans la myopathie de Duchenne. Au total, la contribution globale des CSC à la réparation myocardique reste controversée, notamment en raison de leur faible abondance (environ 1 CSC pour 10 000 cardiomyocytes) et des défis liés à leur isolement et expansion (33).

Cellules souches embryonnaires (CSE)

Les cellules souches embryonnaires (CSE), extraites de la masse interne du blastocyste, sont des cellules pluripotentes capables d'auto-renouvellement illimité et de se différencier en tous les types cellulaires, y compris les cardiomyocytes. Dans des conditions spécifiques, la différenciation des ESC en cardiomyocytes est bien établie, même si la production en grandes quantités de cellules matures et homogènes reste un défi (34). Des études précliniques ont démontré que les cardiomyocytes dérivés des ESC s'intègrent électriquement au myocarde hôte, améliorent ainsi la fonction cardiaque et réduisent la taille des infarctus sans qu'aient été décelées des arythmies dans des modèles murins. Cependant, dans des modèles de primates non humains, bien que la « remuscularization » du cœur infarci paraisse significative, des complications arythmiques transitoires ont été observées, attribuées à la présence persistante d'un contingent de cellules ayant conservé un phénotype de type pacemaker et donc douées d'automaticité (la cinétique de disparition de ces arythmies est parallèle à la maturation de ces cellules *in vivo*) (35). Des stratégies visant à améliorer la survie des cellules, telles que l'utilisation de facteurs pro-survie et le préconditionnement par choc thermique ou activation de la voie Akt, ont été développées pour réduire le taux de mortalité post-transplantation (36). Malgré des résultats précliniques prometteurs et un premier essai chez l'homme rassurant quant à leur innocuité (ESCORT) (37), l'application clinique des ESC pour la régénération

cardiaque reste limitée par des obstacles majeurs, notamment le rejet immunitaire et des préoccupations éthiques. En revanche, les techniques de différenciation permettent d'éliminer efficacement les cellules qui seraient restées pluripotentes au terme du processus de différenciation, ce qui explique qu'à ce jour, avec plus d'une centaine d'essais cliniques dans le monde (toutes indications confondues), il n'a été rapporté aucun cas de tératome. Le recours aux CSE tend néanmoins à diminuer au fur et à mesure que l'utilisation des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) se généralise.

Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) représentent une avancée prometteuse pour la régénération cardiaque. Issues de la reprogrammation de cellules somatiques adultes via l'introduction de quatre facteurs de transcription (Oct-4, Sox-2, Klf4 et c-Myc) (38,39), elles possèdent une capacité d'auto-renouvellement illimitée et peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire, y compris en cardiomyocytes fonctionnels (40,41). De nombreux protocoles ont été développés pour orienter leur différenciation vers la lignée cardiomyogénique, permettant l'obtention de cardiomyocytes présentant des caractéristiques de potentiels d'action nodaux, atriaux et ventriculaires (42). Des études précliniques ont démontré que la transplantation de ces cardiomyocytes dérivés d'iPSC dans des modèles animaux d'infarctus du myocarde améliorait la fonction cardiaque et réduisait le remodelage ventriculaire (43,44). De plus, l'absence de problèmes éthiques liés à l'utilisation d'iPSC, en particulier lorsqu'elles sont dérivées de cellules autologues (et bien que ce modèle ne soit pas privilégié pour des raisons de logistique et de coûts), constitue un atout important par rapport aux CSE. Cependant, l'instabilité génomique, qui résulte de variations préexistantes dans les cellules adultes d'origine ou de mutations survenant lors de la reprogrammation et de la culture, soulève des inquiétudes en termes de sécurité, notamment quant au risque de prolifération maligne (45).

Cellules stromales mésenchymateuses (CSM)

Les CSM sont des cellules souches adultes multipotentes non hématopoïétiques, initialement identifiées dans la moelle osseuse, mais isolables également à partir d'autres tissus comme le tissu adipeux, le placenta, la gelée de Wharton du cordon ombilical ou la pulpe dentaire.

En 2005, l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a établi des critères minimaux pour définir les CSM (46). Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD90, CD105 et CD73 et l'absence de CD14, CD34 et CD45, elles présentent une capacité d'adhérence au plastique et un potentiel d'auto-renouvellement (47,48). Il est toutefois aujourd'hui reconnu que les CSM cultivées *in vitro* forment une population hétérogène, leur composition variant selon l'origine tissulaire, les méthodes d'isolement, les conditions de culture et le nombre de passages (49). Les CSM se caractérisent également par leur capacité à se différencier en plusieurs lignées cellulaires d'origine mésenchymateuse, notamment les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes (50). Il est en revanche admis qu'elles ne peuvent pas se « trans-différencier » en cardiomyocytes.

Après infusion, les CSM ne persistent que quelques jours dans l'organisme ; la majorité d'entre elles meurt en moins de 48 heures (51). Leur efficacité thérapeutique repose donc majoritairement sur un mécanisme de type "hit-and-run", c'est-à-dire une action transitoire par la sécrétion de facteurs solubles et de vésicules extracellulaires. En effet, les CSM sécrètent un large éventail de cytokines, de facteurs de croissance, et d'autres médiateurs bioactifs qui favorisent l'angiogenèse, stimulent la prolifération des cellules endogènes et réduisent l'apoptose (49,52). Ces molécules contribuent également à moduler l'inflammation, créant un environnement propice à la réparation et à la régénération tissulaire. Elles possèdent la capacité d'influencer la réponse immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes T et en favorisant la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (M2) (53). Ce double effet, à la fois régénérateur et anti-inflammatoire, renforce leur intérêt pour la thérapie cellulaire, en particulier dans des pathologies où l'inflammation excessive nuit à la cicatrisation et à la récupération fonctionnelle.

En résumé, les effets principalement anti-inflammatoires et immunomodulateurs des CSM en font des candidats attractifs pour la réparation tissulaire et expliquent le nombre élevé d'essais cliniques ciblant de multiples et très diverses pathologies (54) avec des résultats discordants mais dont le point commun est la démonstration d'une excellente tolérance.

3.3.1. Limitations et perspectives

La thérapie cellulaire pour la régénération cardiaque présente un potentiel important, mais elle se heurte encore à de nombreux obstacles. Parmi eux figurent la faible survie et la prise de

greffe limitée des cellules dans le microenvironnement ischémique du myocarde, ainsi que l'hétérogénéité des sources cellulaires qui complique la standardisation des protocoles d'isolement, d'expansion et d'administration. De plus, les risques associés, comme le rejet immunitaire, l'instabilité génomique et les complications arythmiques freinent encore la translation clinique de ces approches. Enfin, les aspects logistiques liés à la production de quantités suffisantes de cellules de grade clinique pour une utilisation à grande échelle demeurent un défi majeur.

Néanmoins, des perspectives prometteuses émergent, notamment avec l'optimisation des techniques de préconditionnement et l'utilisation de biomatériaux et supports biofonctionnels pour améliorer l'intégration des cellules dans le tissu myocardique. De plus, il apparaît de plus en plus clairement que les effets bénéfiques observés après transplantation cellulaire reposent largement sur les mécanismes paracrines, ce qui ouvre la voie à des approches a-cellulaires pour la réparation cardiaque.

3.4. La thérapie acellulaire

La thérapie a-cellulaire pour la réparation cardiaque se fonde sur l'utilisation de médiateurs bioactifs, tels que les vésicules extracellulaires, les facteurs de croissance et les cytokines, pour reproduire les effets réparateurs des cellules sur le tissu myocardique endommagé sans recourir à leur transplantation directe. Cette approche vise donc à exploiter les effets paracrines des cellules (stimulation de l'angiogenèse, diminution de l'apoptose et de la fibrose, modulation de l'inflammation) tout en contournant les défis liés à l'implantation et à la survie des cellules greffées.

3.4.1. Les vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VE) ont été découvertes pour la première fois dans les réticulocytes de moutons dans les années 1980 (55). Elles constituent un ensemble hétérogène de particules membranaires sécrétées par toutes les types de cellules et jouent un rôle central dans la communication intercellulaire. Initialement perçues comme de simples débris provenant de mécanismes d'élimination des composés inutiles, les VE se sont révélées être des messagers biologiques transportant un cocktail de molécules bioactives (lipides, protéines, ARN messagers, microARN et parfois de l'ADN) qui peuvent moduler la fonction des

cellules cibles en influençant des processus tels que l'angiogenèse, l'immunomodulation, la réparation tissulaire et la réponse inflammatoire (56). On distingue principalement trois types de VE : les exosomes, les microvésicules et enfin les corps apoptotiques ; cependant, plus récemment, d'autres type de VE ont été identifiés comme les ectosomes, migrasomes et les microvésicules membranaires contenant la protéine ARRDC1 (ARMM) (57–59). Ces types de vésicules peuvent être classés selon leur taille et leur récepteur de surface comme présenté dans la Figure 8.

La mise en place des directives MISEV (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles) par l'ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) a constitué une avancée majeure pour l'uniformisation de la caractérisation des VE (60). Ces recommandations fournissent un cadre standardisé pour la collecte, l'isolement, la quantification et la caractérisation des VE, en insistant sur l'importance d'utiliser plusieurs méthodes complémentaires pour évaluer leur taille, leur densité, leur composition protéique et leur origine cellulaire. L'objectif des MISEV est d'assurer la reproductibilité et la comparabilité des résultats entre différentes études, en établissant des critères minimaux d'information à fournir, tels que les conditions expérimentales, les marqueurs spécifiques analysés et les techniques d'isolement employées.

L'utilisation des VE comme approche thérapeutique a-cellulaire suscite un intérêt croissant en raison de leur faible immunogénicité et de leur excellente stabilité. Contrairement aux cellules souches, ils ne risquent pas d'induire des réactions immunitaires ou de former des tumeurs, ce qui en fait une alternative plus sûre et plus contrôlable pour les applications en médecine régénérative (61).

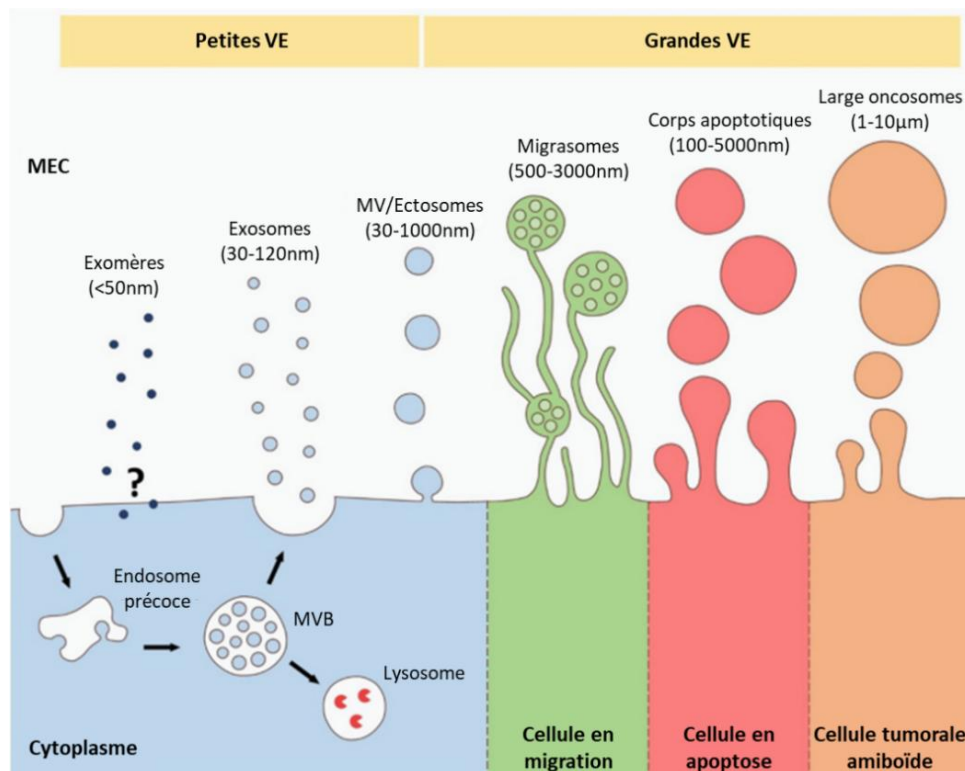


Figure 8 : Types de vésicules extracellulaires différenciées selon leur taille et leur origine. Adapté de Kang et al., 2021 (62)

3.4.1.1. Biogénèse des vésicules extracellulaires

La biogénèse des VE varie en fonction de leur type et de leur origine.

Exosomes

Les exosomes (30-120nm) sont des vésicules d'origine endosomale qui se forment à l'intérieur des corps multivésiculaires (MVB) avant d'être libérés par exocytose. Contrairement aux autres types de VE, les exosomes proviennent de l'invagination de la membrane des endosomes tardifs, conduisant à la formation de vésicules intraluminales (ILV). Ces ILV sont ensuite libérées dans l'espace extracellulaire par fusion des MVB avec la membrane plasmique (61) (Figure 9).

- 1) Formation des endosomes précoces : L'endocytose entraîne l'internalisation de la membrane plasmique sous forme de vésicules intracellulaires qui fusionnent pour former des endosomes précoces.

- 2) Transition vers les endosomes tardifs/MVB : L'endosome précoce se transforme en endosome tardif, aussi appelé MVB, via un bourgeonnement interne de la membrane endosomale, contenant ainsi des ILV.
- 3) Fusion avec la membrane plasmique et libération : Certains MVB fusionnent avec la membrane plasmique, libérant ainsi les exosomes dans l'espace extracellulaire.
- 4) Capture et signalisation : Une fois libérés, les exosomes interagissent avec d'autres cellules via des récepteurs de surface, une fusion membranaire ou une endocytose.

Ce processus est médié par deux voies principales :

Voie dépendante du complexe Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) :

La formation des ILV dépend souvent du complexe ESCRT, qui permet le tri des protéines et l'invagination de la membrane. Le complexe ESCRT est constitué de quatre sous-complexes (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III), chacun ayant un rôle précis dans la biogenèse des exosomes (63) :

- ESCRT-0 capture les protéines ubiquitylées et initie le recrutement des autres complexes.
- ESCRT-I et ESCRT-II provoquent l'invagination de la membrane endosomale et recrutent ESCRT-III.
- ESCRT-III assure la fission des ILV et leur détachement de la membrane endosomale.
- Dissociation du complexe ESCRT par Vps4 après formation des ILV.

Voie indépendante d'ESCRT : Bien que la majorité des études aient mis en évidence le rôle central du complexe ESCRT, des voies alternatives indépendantes ont été identifiées. Ces voies impliquent des lipides membranaires spécifiques, des protéines tétraspanines, et des mécanismes de tri spécifiques qui ne nécessitent pas l'intervention du complexe ESCRT (64) :

- Lipides membranaires et céramides : Les membranes des endosomes tardifs sont enrichies en lipides spécifiques, qui jouent un rôle clé dans l'invagination et la formation des ILV.
- Protéines tétraspanines (CD63, CD81, CD9 et CD82) : Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires impliquées dans la formation des microdomaines membranaires et le tri des protéines dans les exosomes.
- Protéines de liaison aux ARN et protéines chaperonnes : le tri des protéines s'appuie sur des protéines de liaison aux ARN. Ces protéines reconnaissent des motifs spécifiques

sur les ARN et les guident vers les exosomes. En parallèle, des chaperons moléculaires favorisent l'incorporation de protéines spécifiques dans les exosomes.

- **Protéines Rab** : Une fois les ILV formées dans les MVB, elles peuvent être dirigées vers la membrane plasmique pour être libérées sous forme d'exosomes par les protéines Rab.

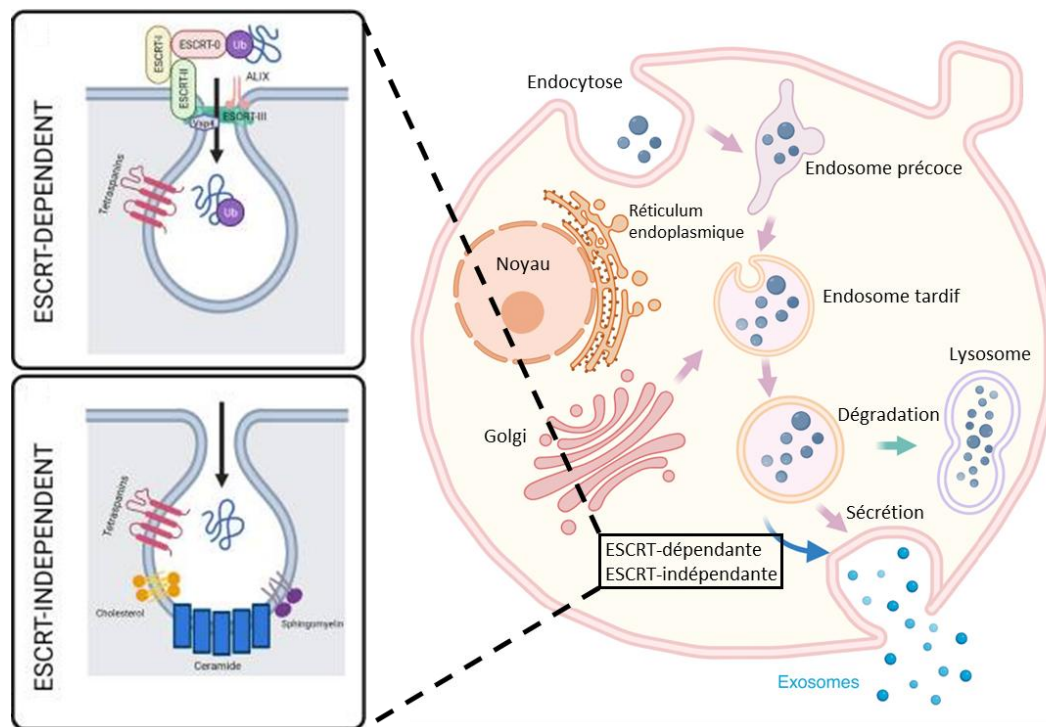


Figure 9 : Biogenèse des exosomes. Adapté de Fag et al., 2024 (65) et de Gioseffi et al., 2021 (66)

Ectosomes/Microvésicules

Les microvésicules ou ectosomes (30-1000 nm) se forment par un bourgeonnement direct de la membrane plasmique (67) (Figure 10):

- 1) Réorganisation du cytosquelette : L'activation du calcium intracellulaire stimule la calpaïne, qui coupe la liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine.
- 2) Exposition de la phosphatidylsérine : La perte d'asymétrie membranaire entraîne l'exposition de la phosphatidylsérine à la surface externe, ce qui facilite la formation des microvésicules.
- 3) Bourgeonnement et détachement : Sous l'effet de protéines comme ARF6, RhoA et ROCK, la membrane plasmique bourgeonne et libère des microvésicules contenant des protéines spécifiques à la cellule d'origine.

- 4) Interaction avec les cellules cibles : Les microvésicules peuvent être endocytées ou fusionner avec les membranes cibles pour transférer leur contenu.

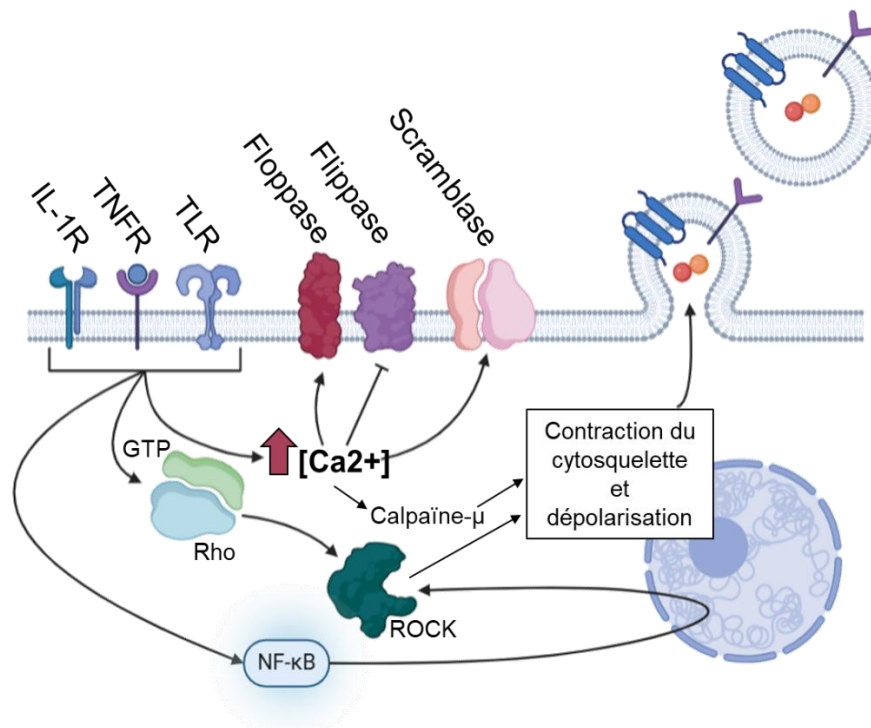


Figure 10 : Réorganisation de l'actine et du cytosquelette et libération des MV. Adapté de Oggero et al., 2019 (68)

ARMM (ARRDC1-Mediated Microvesicles)

Les microvésicules médiées par ARRDC1 (30-150 nm) sont formées par un processus distinct, similaire au bourgeonnement viral (69,70).

- 1) Recrutement de la protéine ARRDC1 : Cette protéine, localisée sur la face cytosolique de la membrane plasmique, interagit avec des protéines du complexe ESCRT et Tsg101 pour initier le bourgeonnement.
- 2) Formation et détachement : Contrairement aux exosomes, qui sont libérés via les MVB, les ARMM bourgeonnent directement de la membrane plasmique.

ARRDC1 est non seulement indispensable à la formation des ARMMs, mais elle en constitue également le seul facteur requis. En effet, sa simple surexpression dans les cellules suffit à stimuler la production de ces vésicules. Cette propriété ouvre la voie à une fabrication maîtrisée des ARMMs grâce aux techniques actuelles de bioproduction.

Corps apoptotiques

Les corps apoptotiques (1-5 μm) sont formés lors de l'apoptose et servent à l'élimination des débris cellulaires (71,72) (Figure 11).

- 1) Activation de l'apoptose : Sous l'effet de signaux pro-apoptotiques, la cellule commence à se fragmenter.
- 2) Externalisation de la phosphatidylsérine : La membrane plasmique expose des signaux comme la phosphatidylsérine, facilitant leur reconnaissance par les macrophages.
- 3) Bourgeonnement de la membrane plasmique : Sous l'action de plusieurs kinases comme ROCK1, LIMK1 et PK2, la cellule subit des modifications du cytosquelette qui favorisent la formation de protrusions membranaires (microtubules spikes et apoptopodes).
- 4) Phagocytose par les cellules immunitaires : À la fin du processus, la fragmentation des apoptopodes conduit à la libération des corps apoptotiques, qui sont ensuite phagocytés par les cellules immunitaires environnantes, évitant ainsi la libération du contenu dans la cellule et limitant l'inflammation.

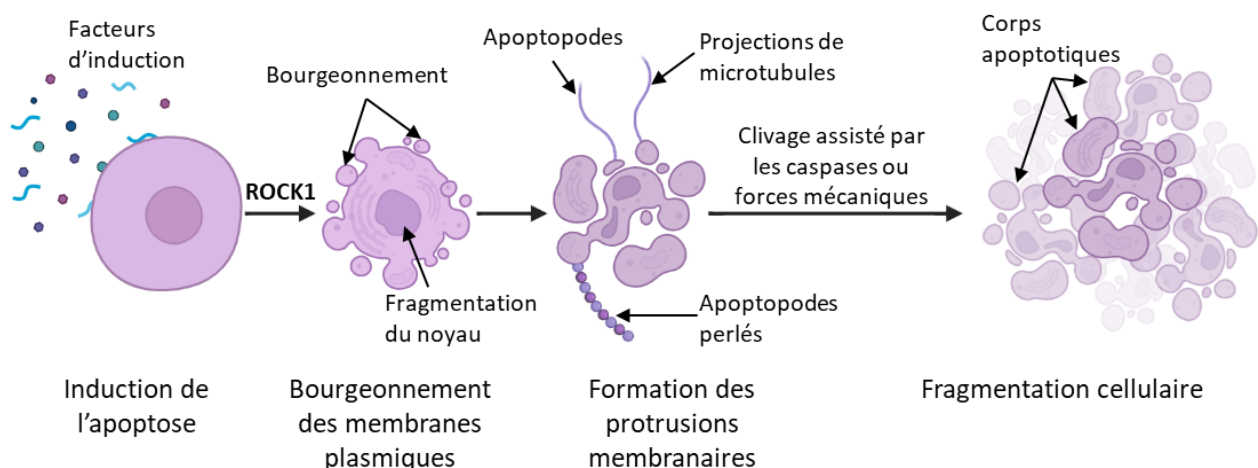


Figure 11 : La formation et la libération des corps apoptotiques. Adapté de Han et al., 2024 (72)

Migrasomes

Les migrasomes sont des structures récemment découvertes (73), impliquées dans la communication intercellulaire pendant la migration cellulaire. Elles se forment aux points d'intersection des filopodes rétractiles (fibres de rétraction) pendant la migration cellulaire (74–76) (Figure 12).

- 1) Nucléation : La formation des migrasomes débute par un enrichissement en lipides

(sphingolipides et sphingomyéline) et protéines spécifiques (intégrines) aux sites de formation des migrasomes. L'activation des intégrines favorise l'adhésion des filopodes à la MEC, jouant un rôle critique dans l'ancrage des fibres de rétraction et la stabilisation des sites de formation des migrasomes.

- 2) Maturation : Une fois le site de formation établi, plusieurs régulateurs moléculaires coordonnent la maturation des migrasomes :
 - a) Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) est une molécule clé qui coordonne l'organisation du site de formation.
 - b) Les intégrines interagissent avec les tétraspanines (TSPAN4, TSPAN7, TSPAN9) pour amorcer la phase d'expansion.
- 3) Expansion : Un mécanisme appelé instabilité de perlage membranaire (tube pearling instability) a été identifié comme un déclencheur de l'expansion. Lorsqu'une structure tubulaire (comme un filopode) est soumise à un changement rapide de tension, des sphères se forment le long d'elle. Ces gonflements sont ensuite stabilisés, favorisant la transformation en migrasomes. L'augmentation locale de calcium via la protéine Syt1 favorise la stabilisation des gonflements transitoires, qui deviennent ensuite des migrasomes pleinement matures. Les tétraspanines s'organisent en macrodomaines enrichis en cholestérol et augmentent la rigidité membranaire, stabilisant ainsi la structure des migrasomes. Une fois pleinement formés, les migrasomes sont libérés dans le microenvironnement extracellulaire lorsque les filopodes se rompent.

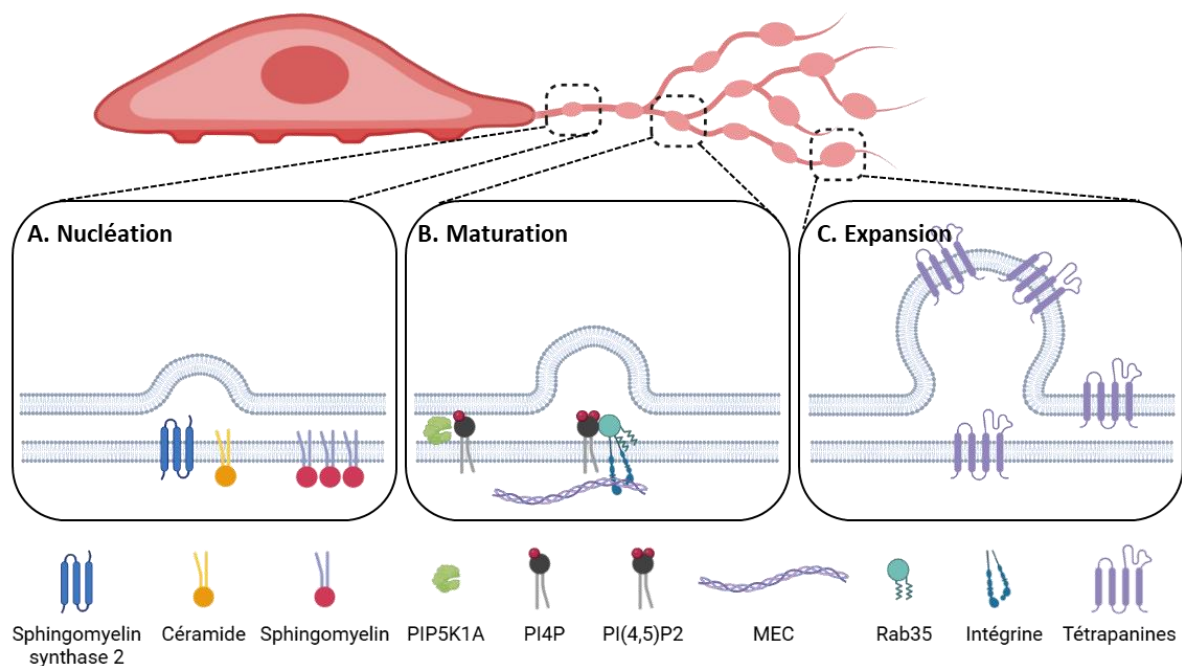


Figure 12 : Biogénèse des migrasomes en trois phases. Adapté de Jiao and Yu, 2024 (74)

Oncosomes

Les oncosomes sont un type spécifique de VE larges, dérivées de la membrane plasmique des cellules cancéreuses agressives. Leur formation est intimement liée aux processus de migration cellulaire et de progression tumorale, notamment dans le cadre de la transition mésenchymateuse-amiboïde (77,78) (Figure 13).

- Transition mésenchymateuse-amiboïde : La migration amiboïde est une alternative à la migration mésenchymateuse qui ne repose pas sur la dégradation matricielle. Elle est induite par l'activation de RhoA et ROCK et favorisée par la perte de DIAPH3, une protéine régulant l'organisation du cytosquelette.
- Formation et bourgeonnement membranaire : Comme les MV, les oncosomes sont générés par bourgeonnement de la membrane plasmique. Leur production est amplifiée par l'activation de l'ADP-ribosylation factor 6 (ARF6), une GTPase impliquée dans la dynamique membranaire et le détachement des VE.
- Libération des oncosomes : La surexpression d'Akt actif favorise leur libération.

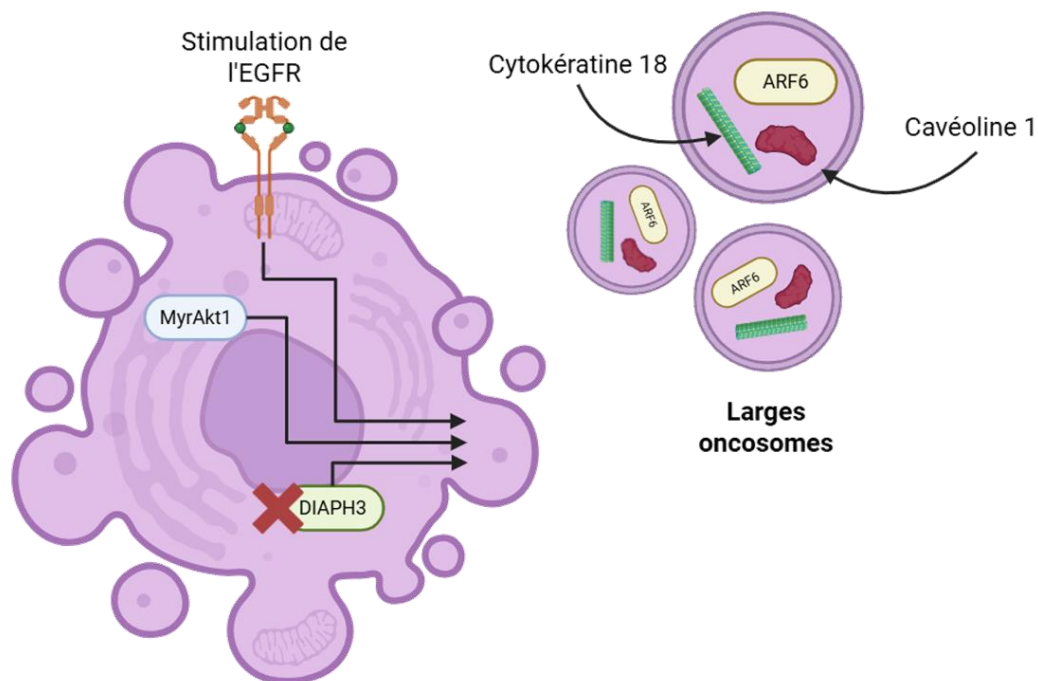


Figure 13 : Biogénèse des larges oncosomes. Tiré de Ozkocak et al., 2022 (79)

3.4.1.2. Contenu et délivrance des vésicules extracellulaires

La composition des VE dépend de leur mode de biogénèse, du type cellulaire d'origine et des conditions physiologiques environnantes. De manière générale, toutes les VE contiennent une diversité de protéines, lipides et acides nucléiques, dont le cargo peut être spécifique à chaque type de vésicule et de cellule donneuse (63). De nombreuses études ont été menées pour analyser et caractériser leur contenu, aboutissant à la création de bases de données dédiées. Actuellement, trois bases de données publiques centralisent ces informations : Exocarta (80), Vesiclepedia (81) et EVpedia (82). Ces bases recensent les protéines, acides nucléiques et lipides identifiés dans les VE, ainsi que les protocoles d'isolement et de purification utilisés pour leur caractérisation. La Figure 14 donne un aperçu des différentes classes de biomolécules présentes dans les VE.

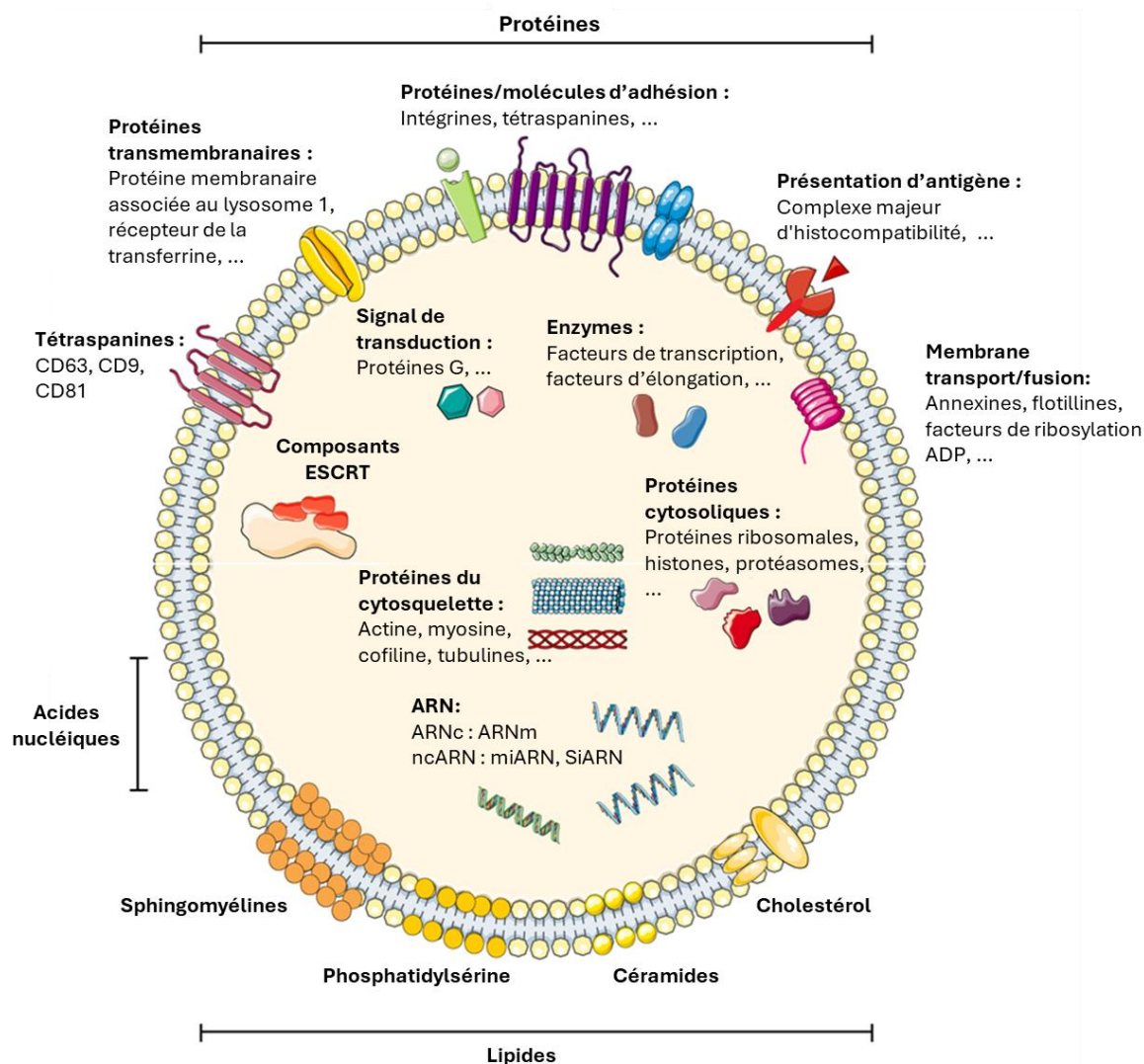


Figure 14 : Composition moléculaire globale des vésicules extracellulaires. Tiré de Shahraki et al., 2023 (83)

Il est désormais reconnu que les VE, grâce à leur contenu biologiquement actif spécifique représentent un mode innovant de communication intercellulaire. La reconnaissance et l'absorption des VE par les cellules cibles sont probablement influencées par leur taille et la composition de leur surface (84). Le transfert de leur cargo dans les cellules réceptrices peut se faire par trois mécanismes principaux : (1) interaction directe avec des récepteurs membranaires, activant ainsi des voies de signalisation intracellulaire, (2) fusion des membranes, ou (3) internalisation cellulaire par endocytose avec dans ces deux derniers cas, libération du cargo dans le cytosol qui peut toutefois n'être que partiellement contributif aux effets protecteurs des VE dans la mesure où une fraction de ce cargo n'échappe pas à la dégradation dans le système lysosomal (Figure 15). Ainsi, les cellules parentales peuvent moduler l'activité de cellules proches ou distantes en utilisant les VE comme les vecteurs de

leurs signaux (64).

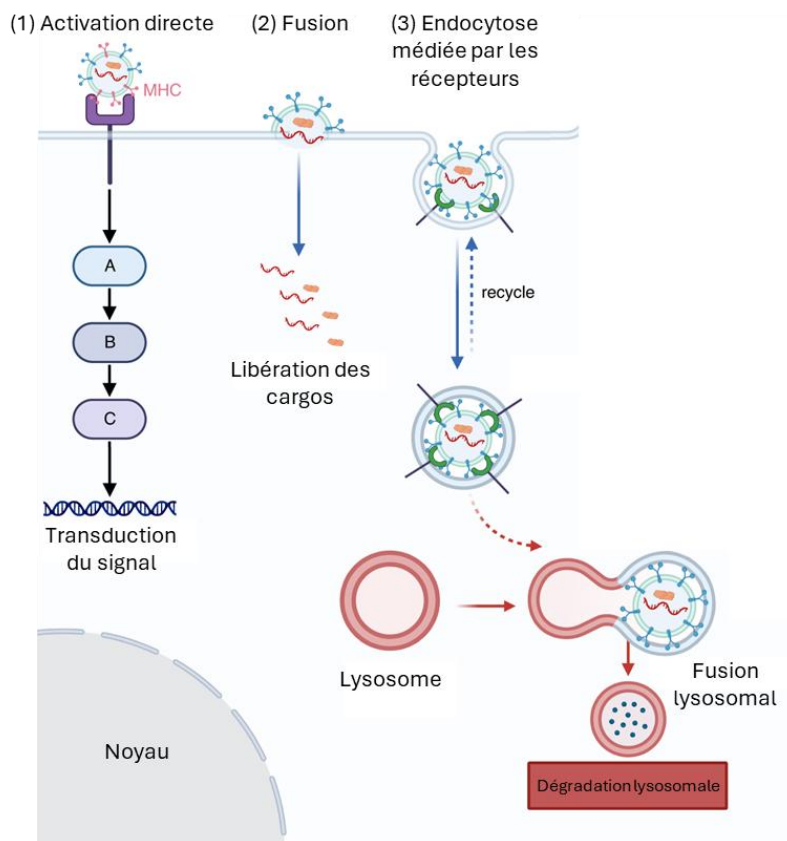


Figure 15 : La voie et le devenir des VE après l'internalisation. Adapté de Fang et al., 2024 (65)

3.4.2. Perspectives et limitations

Dans le cadre de l'IC, de nombreuses études précliniques ont démontré que les VE exercent des effets thérapeutiques similaires à ceux de la thérapie cellulaire (85–87). Les VE dérivées des CSM, en particulier, ont montré des résultats prometteurs en améliorant la fraction d'éjection ventriculaire et en réduisant la taille de l'infarctus dans des modèles de souris et de rat (88–90).

Au-delà des effets protecteurs de leur contenu (Figure 14), les VE ont l'avantage d'une immunogénicité réduite par comparaison avec les cellules allogéniques ou xénogéniques, et permettent ainsi d'éviter le recours à une immunosuppression (91,92). Les VE présentent plusieurs autres avantages par rapport à la thérapie cellulaire : leur sécurité d'utilisation, car du fait de l'absence de noyau, elles ne présentent pas de risque de prolifération incontrôlée ou de différenciation non désirée, limitant ainsi les complications telles que les tumeurs (93) ; une absence d'intégration dans le tissu myocardique qui prévient du risque de troubles du rythme ; la possibilité d'une optimisation thérapeutique par modulation de leur contenu en protéines ou

en microARN (94) ; un mode de production qui se prête mieux que pour les cellules à des procédures standardisées se rapprochant de celles d'un médicament (et les VE sont d'ailleurs classées dans la catégorie des médicaments biologiques et non, comme les cellules, dans celles des médicaments de thérapie innovante) ; et une bonne stabilité dans des conditions de stockage appropriés (-80°C) qui permet une utilisation immédiate, à la demande. Elles peuvent enfin (mais comme les cellules) être incorporées dans des biomatériaux ou des hydrogels (95). Ces avantages donnent donc aux VE un potentiel translationnel plus élevé que la thérapie cellulaire (93).

Cependant, bien que les VE semblent plus adaptées aux exigences cliniques, leur mode de production et d'isolement reste encore un objet de discussions. La purification des VE est en effet un processus complexe. Différentes méthodes d'isolement, telles que l'ultracentrifugation, la chromatographie ou la précipitation par polymères, peuvent aboutir à des populations hétérogènes de VE contenant des contaminants, notamment des protéines solubles et des agrégats lipidiques, ce qui peut influencer leur efficacité thérapeutique et leur innocuité (92,96). De plus, la caractérisation précise des VE reste un défi majeur. L'absence de marqueurs spécifiques pour différencier les différents sous-types de VE rend difficile l'identification des populations les plus bénéfiques pour la réparation cardiaque. Malgré les recommandations du MISEV , il existe encore un manque de consensus sur les méthodes de quantification et d'évaluation de la pureté des VE, ce qui complique les comparaisons entre les études et leur validation pour un usage clinique (60).

La Figure 16 résume les différents facteurs qui peuvent avoir un impact sur les effets thérapeutiques des VE.

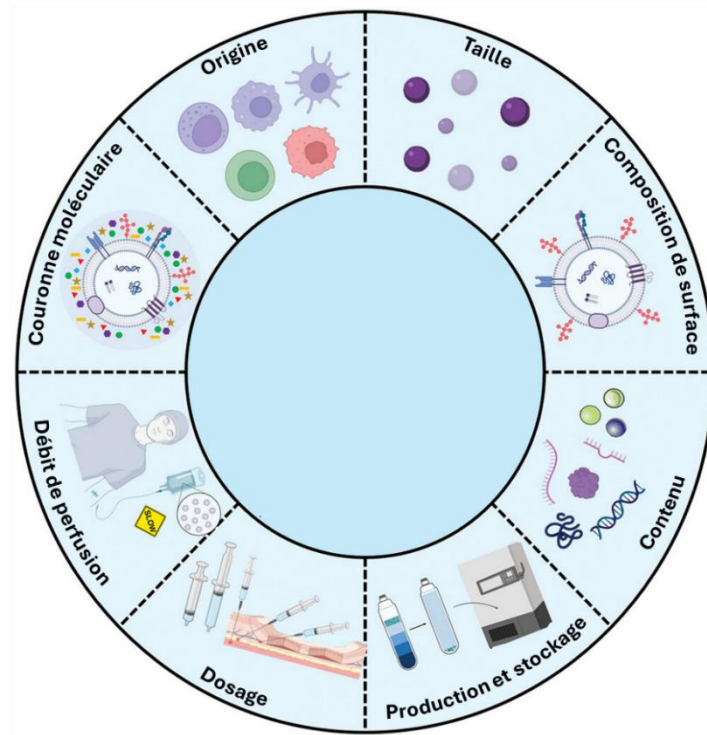


Figure 16 : Exemples de facteurs pouvant avoir un impact sur l'effet thérapeutique des VE. Adapté de Xia et al., 2024 (92)

3.5. Les modes d'administration

L'administration des cellules et des VE pour la réparation cardiaque repose sur plusieurs stratégies, chacune ayant des avantages et des limites en termes d'efficacité, de biodisponibilité et de sécurité (Figure 17).

- **Injection intraveineuse (IV)** : Cette approche simple et peu invasive permet une diffusion systémique des cellules et des VE, mais avec un risque d'accumulation dans d'autres organes comme le foie, la rate ou les poumons, réduisant ainsi leur biodisponibilité pour le cœur (97,98).
- **Injection intracoronaire** : Cette méthode consiste à injecter les cellules ou les VE directement dans l'artère coronaire par un cathéter. Toutefois, la rétention cellulaire dans le tissu cardiaque est faible en raison du flux sanguin qui entraîne une dispersion des cellules (99–101).
- **Injection intramyocardique** : Les cellules ou les VE sont injectées directement dans le myocarde soit par voie épicardique, sous contrôle de la vue, lors d'une intervention chirurgicale cardiaque concomitante (ou en procédure isolée) soit par voie endomyocardique à l'aide d'un cathéter guidé par l'imagerie. Cependant, l'injection directe

peut provoquer des lésions tissulaires (99,100,102) tandis que les forces de cisaillement subies par les cellules lors de leur passage dans le cathéter et l'aiguille sont potentiellement dommageables (103).

- **Encapsulation dans des biomatériaux (hydrogels, patches, nanoparticules) :** Pour améliorer la rétention des cellules et la diffusion prolongée des VE, ces dernières peuvent être intégrées dans des hydrogels injectables ou dans des patches implantables directement sur le cœur. Ces systèmes permettent une libération contrôlée des VE, augmentant leur biodisponibilité et leur effet thérapeutique à long terme (102,104).

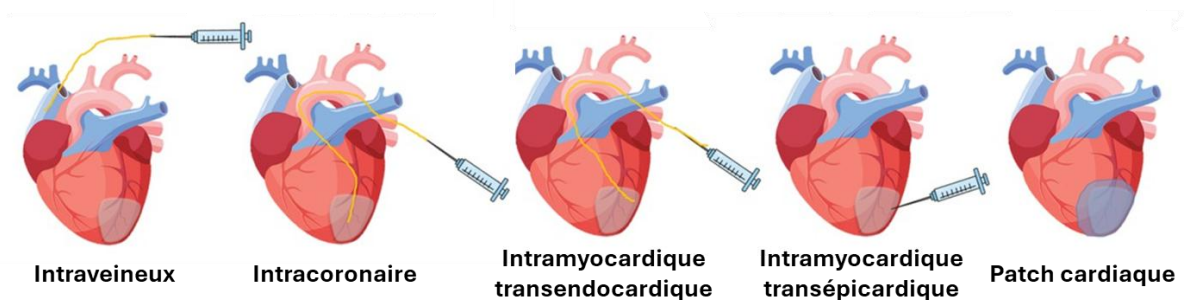


Figure 17 : Modes d'administration des cellules ou des VE au cœur. Adapté de Duan, 2020 (105)

3.5.1. Les biomatériaux

L'utilisation de biomatériaux comme support de délivrance pour les cellules et les VE constitue une approche innovante pour améliorer l'efficacité des thérapies régénératives cardiaques. Ces supports permettent d'optimiser la rétention, la protection et la distribution des agents thérapeutiques dans le tissu myocardique lésé, tout en favorisant leur intégration et leur action prolongée.

Les biomatériaux sont fabriqués à partir de différents types de matériaux, principalement naturels, synthétiques ou hybrides :

- **Polymères naturels** (collagène, fibrine, acide hyaluronique) : Biocompatibles et biodégradables, ils permettent un relargage contrôlé des facteurs bioactifs.
- **Polymères synthétiques** : Plus résistants mécaniquement, ils peuvent être modifiés pour des propriétés spécifiques (conductivité, porosité).
- **Patches hybrides** : Combinent MEC et polymères synthétiques pour améliorer la stabilité et l'intégration au tissu cardiaque.

Il existe deux types principaux de biomatériaux utilisés pour la thérapie régénérative cardiaque, les hydrogels injectables et les patches implantables.

Les hydrogels sont des biomatériaux hautement hydratés qui permettent l'encapsulation de cellules vivantes ou de particules inertes comme les VE. Ces supports injectables peuvent offrir une protection contre les forces de cisaillement mécaniques et fournir aux cellules/VE injectées un microenvironnement 3D bien contrôlé (106). Les hydrogels peuvent également être optimisés pour obtenir des propriétés mécaniques similaires à celles de la MEC des tissus natifs et/ou fournir aux cellules des stimuli biochimiques qui peuvent les orienter vers les voies de maturation ou de différenciation souhaitées (104). Par exemple, Wu et al. ont utilisé un hydrogel dérivé d'une MEC porcine chargée en SDF-1 pour encapsuler des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC-CM), améliorant ainsi l'angiogenèse et réduisant la fibrose dans un modèle murin d'IM (107). Une autre étude a encapsulé des CSM dans un hydrogel à base de gélatine réticulée par transglutaminase, ce qui a permis une meilleure rétention et un effet cardioprotecteur accru par rapport aux souris traitées avec les CSM seules (108).

Les patches cardiaques, contrairement aux injections intramyocardiques de cellules ou de VE, permettent une meilleure rétention des agents thérapeutiques et offrent un support mécanique favorisant la réparation tissulaire. Ces patches assurent plusieurs fonctions essentielles, notamment en renforçant la paroi cardiaque affaiblie, en améliorant la rétention et la survie cellulaires et en permettant la libération contrôlée de facteurs bioactifs tels que des VE, des cytokines ou des microARNs. De plus, certains patches sont conçus pour être électroconducteurs, facilitant ainsi la transmission des signaux électriques et réduisant le risque d'arythmies (98). Plusieurs études précliniques ont déjà montré que l'implantation d'un patch cardiaque dans un modèle d'IM permet de réduire l'apoptose cellulaire, de favoriser l'angiogenèse et d'inhiber la fibrose, ce qui réduit la taille de l'infarctus et améliore la fonction cardiaque (109). Cependant, l'une des contraintes majeures des patches cardiaques réside dans la nécessité de les préparer juste avant utilisation afin de préserver la viabilité des cellules, ce qui rend leur stockage à long terme impossible et limite ainsi leur application en clinique. Pour pallier ce problème, une équipe a créé un patch cardiaque prêt à l'emploi composé d'une MEC décellularisée de myocarde porcine et de cellules stromales cardiaques synthétiques. Ce patch cardiaque artificiel entièrement a-cellulaire (artCP) a conservé son efficacité après une cryoconservation de longue durée. Dans un modèle d'IM aigu chez le rat,

la transplantation de l'artCP a favorisé la récupération cardiaque en réduisant la cicatrisation, en favorisant l'angiomyogenèse et en stimulant la fonction cardiaque (110).

De nouvelles approches en bio-impression 3D permettent également de concevoir des patches avec des propriétés structurelles et mécaniques personnalisées. Ces nouvelles technologies permettant l'automatisation de la production des patches pourraient être une solution à envisager pour relever les défis de l'application clinique à grande échelle.

4. Techniques de bio-impression 3D

La bio-impression est définie comme la structuration spatiale de cellules vivantes et d'autres produits biologiques (VE, facteurs de croissance,...), par empilement et assemblage à l'aide d'une technique de dépôt couche par couche assistée par ordinateur, en vue de la fabrication de tissus et d'organes vivants (111).

4.1. Les types d'impression

La première technique de bio-impression à être utilisée est le jet d'encre, inspirée des imprimantes 2D classiques. Initialement utilisée pour la mise en forme de plastiques ou de métaux, elle a permis par la suite de créer des architectures complexes et poreuses, ce qui la rend intéressante pour l'ingénierie tissulaire. Ces pores servent de « logement » pour les cellules et les protègent de l'environnement hostile qui les entoure, permettant leur survie et leur prolifération. Avec l'essor de l'impression de cellules vivantes, d'autres technologies de bio-impression sont apparues, telles que la bio-impression par extrusion, par laser et la stéréolithographie.

4.1.1. Bio-impression par jet d'encre

La bio-impression par jet d'encre repose sur la déposition contrôlée de bio-encre sous forme de microgouttelettes. Ces bio-encres sont composées d'un prépolymère hydrogel encapsulant des cellules vivantes, qui est stocké dans une cartouche reliée à une tête d'impression. L'impression est alors pilotée électroniquement pour créer des structures tridimensionnelles couche par couche (112,113).

La formation des gouttelettes repose sur deux principaux mécanismes (114):

- A. Activation thermique : l'impression à jet d'encre thermique repose sur la génération de bulles de chaleur par un actionneur thermique, qui comprime l'encre et expulse les gouttelettes à travers la buse. L'encre est localement chauffée pendant quelques microsecondes, atteignant des températures de 250°C à 350°C, provoquant une vaporisation rapide et l'expansion des bulles, qui génèrent la force nécessaire à l'éjection de l'encre. Malgré ces températures élevées, le temps de chauffe extrêmement court limite l'élévation globale de température du liquide à seulement 4°C à 10 °C au-dessus de la température ambiante. Ainsi, bien que l'exposition à la chaleur puisse entraîner une légère perte cellulaire, la majorité des cellules reste viable (Figure 18A).
- B. Activation piézoélectrique : L'impression à jet d'encre piézoélectrique utilise des céramiques piézoélectriques pour déformer la chambre d'encre et expulser les gouttelettes de manière contrôlée, sans générer de chaleur, ce qui préserve mieux la viabilité cellulaire. Elle permet d'ajuster les paramètres d'éjection pour optimiser la taille et la forme des gouttelettes, avec des buses de différentes tailles. Cependant, la sonication induite par le processus peut endommager les membranes cellulaires, et l'impact des gouttelettes sur le substrat peut entraîner une perte cellulaire (Figure 18B).

Ces mécanismes permettent un contrôle précis de la taille et de la fréquence des gouttelettes, assurant ainsi une impression fine et reproductible.

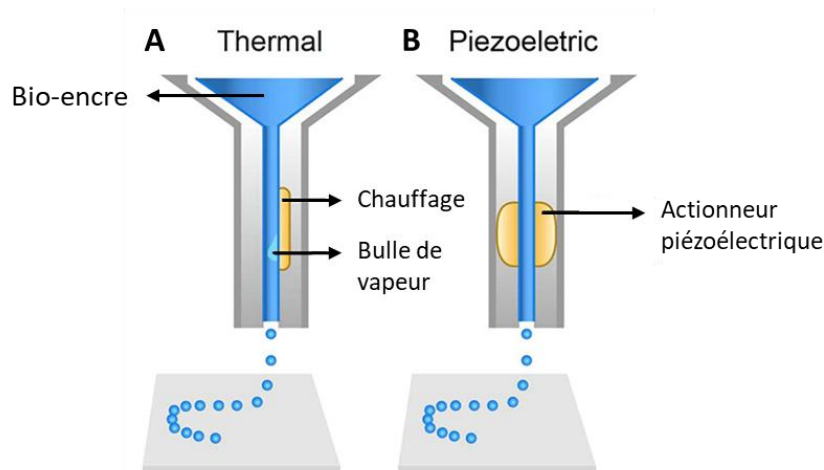


Figure 18 : Schéma de la bio-impression à base de jet d'encre (A : chauffage ; B : actionneur piézoélectrique).
Adapté de Pu et al., 2024 (115)

La bio-impression par jet d'encre présente plusieurs avantages majeurs qui en font une

technologie prometteuse en ingénierie tissulaire. Son coût relativement faible par rapport aux autres méthodes de bio-impression la rend accessible, notamment grâce à sa similarité avec les imprimantes classiques. Elle offre également une haute vitesse d'impression, en permettant l'utilisation de plusieurs têtes d'impression en parallèle, ce qui accélère la fabrication des structures biologiques. Un autre atout majeur est la viabilité cellulaire élevée (80-90 %), grâce aux faibles contraintes mécaniques subies par les cellules lors du processus d'impression. De plus, sa précision et résolution élevées (jusqu'à 10 μm) permettent un positionnement précis des cellules et des biomatériaux, favorisant la création de structures complexes (112).

Cependant, cette technique présente aussi des limitations qui freinent son application clinique à grande échelle. La viscosité des bio-encres utilisées est limitée car les têtes d'impression actuelles ne permettent pas d'extruder des matériaux trop visqueux, ce qui restreint le choix des biomatériaux compatibles. Un autre défi est l'effet de sédimentation des cellules qui peuvent se déposer au fond de la cartouche au fil du temps, altérant la viscosité de la bio-encre et risquant d'obstruer les têtes d'impression (116). De plus, la capacité de stockage limitée des cartouches réduit la possibilité d'imprimer de grands volumes de tissus en une seule session, nécessitant des recharges fréquentes. Enfin, bien que cette technologie offre une impression rapide et précise, elle ne permet pas encore de créer des tissus complexes, un critère essentiel pour l'implantation d'organes bio-imprimés en médecine régénérative (112).

4.1.2. Bio-impression par extrusion

L'impression par extrusion (EBB – Extrusion-based bioprinting) est une modification de l'impression à jet d'encre qui permet d'imprimer les matériaux visqueux que les imprimantes à jet d'encre ne peuvent pas déposer. Dans ce processus, l'encre biologique, qui est un biomatériau, est extrudée à l'aide d'une seringue afin de générer des filaments continus pour construire des structures en 3D. Les systèmes d'actionnement sont classés en trois modes pour pousser la bio-encre à travers la buse : pneumatique, à piston et à vis (113) :

- A. Système pneumatique : le système pneumatique utilise de l'air comprimé pour appliquer une pression sur la bio-encre contenue dans une cartouche, la poussant ainsi à travers une buse. La pression appliquée est régulée électroniquement, et plus elle est

élevée, plus le débit d'extrusion est important (Figure 19A).

- B. Système à piston : le système à piston fonctionne en poussant mécaniquement la bio-encre avec un piston mobile. Celui-ci est contrôlé par un moteur qui règle la vitesse et la pression d'extrusion (Figure 19B).
- C. Système à vis : le système à vis utilise une vis rotative pour propulser la bio-encre vers la buse. Ce mécanisme permet une extrusion plus fine et plus contrôlée, en particulier pour les bio-encres visqueuses (Figure 19C).

Les systèmes mécaniques (piston ou vis) offrent un meilleur contrôle du flux de matériau, tandis que les systèmes pneumatiques sont plus simples mais peuvent présenter un délai dû au volume de gaz comprimé. Les systèmes à vis sont particulièrement adaptés aux hydrogels de haute viscosité (117). Le substrat sur lequel est imprimé la bio-encre peut être solide (par exemple, une boîte de culture) ou liquide (par exemple, un milieu de croissance).

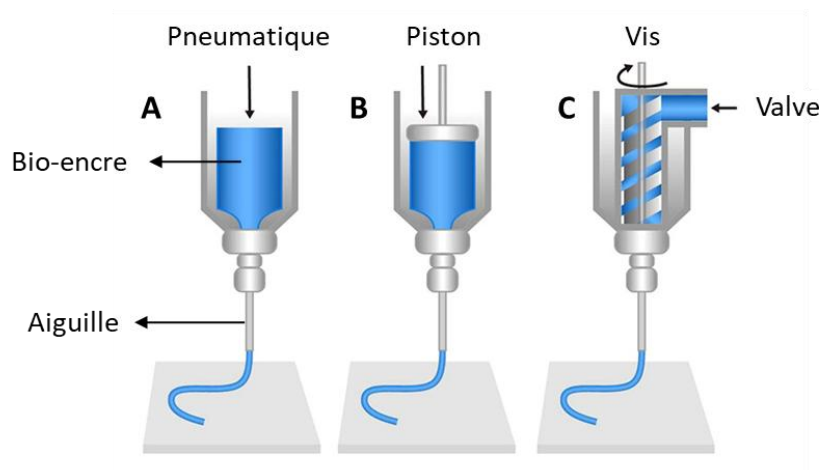


Figure 19 : Principes de la bio-impression par extrusion. Adapté de Pu et al., 2024 (115)

Divers paramètres influencent la EBB, notamment la pression et la vitesse d'extrusion, l'intervalle du tracé, le diamètre de la buse, la vitesse de déplacement et la température (118). Bien que cette technique permette l'impression d'une plus grande variété de matériaux, elle expose également les cellules encapsulées à des contraintes mécaniques élevées, pouvant affecter leur viabilité (112). Comparée à la bio-impression par jet d'encre, elle permet d'obtenir des densités cellulaires plus élevées, mais avec une vitesse et une résolution d'impression moins importantes. L'un des principaux défis de la bio-impression par micro-extrusion réside dans le maintien de la viabilité cellulaire. En raison des forces de cisaillement générées lors de l'extrusion, la survie des cellules est généralement inférieure à celle observée avec la bio-

impression par jet d'encre. Ces contraintes augmentent proportionnellement à la pression d'extrusion et au diamètre de la buse. Ainsi, un équilibre doit être trouvé entre la préservation de la viabilité cellulaire, la précision de l'impression et sa rapidité afin d'optimiser la qualité des tissus bio-imprimés (119).

4.1.3. Bio-impression assistée par laser

La bio-impression assistée par laser (LAB – Laser-Assisted Bioprinting) est une technologie de bio-impression de haute précision qui utilise un faisceau laser pour déposer des cellules et des biomatériaux sur un substrat de manière contrôlée. Contrairement aux autres techniques d'impression (jet d'encre, extrusion), cette méthode est sans contact et permet de manipuler les cellules avec une grande précision tout en minimisant les forces mécaniques qui pourraient les endommager. Ce procédé comprend généralement les étapes suivantes (120,121) (Figure 20) :

- 1) Préparation du biofilm : Un film mince de bio-encre (souvent composé d'hydrogels et de cellules vivantes) est déposé sur une plaque de verre recouverte d'un absorbeur laser (souvent une couche de titane ou d'or).
- 2) Génération de l'impulsion laser : Un laser pulsé est focalisé sur l'absorbeur, ce qui génère une onde de pression locale et vaporise instantanément une fine couche de biomatériau sous-jacent.
- 3) Expulsion et dépôt des cellules : L'onde de pression propulse une gouttelette contenant les cellules et les biomatériaux vers un substrat, où les cellules s'organisent pour former la structure biologique souhaitée.
- 4) Assemblage couche par couche : Ce processus est répété pour construire des structures complexes en 3D.

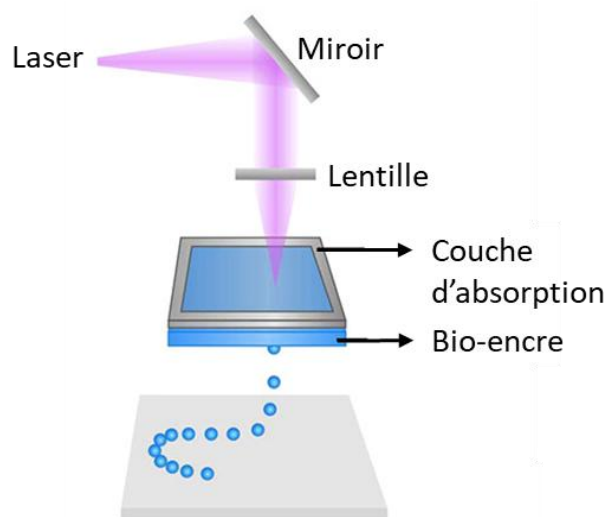


Figure 20 : Principe de la bio-impression assistée par laser. Adapté de Pu et al., 2024 (115)

La LAB présente plusieurs avantages par rapport aux autres technologies de bio-impression, notamment une haute résolution, une grande précision spatiale et l'absence de stress mécanique sur les cellules. Contrairement à la bio-impression par extrusion ou par jet d'encre, elle utilise un laser pour générer des microgouttelettes de bio-encre, permettant ainsi un dépôt précis et contrôlé des cellules et biomatériaux (121). Cette méthode offre une excellente viabilité cellulaire car elle évite les forces de cisaillement et les hautes pressions qui peuvent endommager les cellules. De plus, elle permet l'impression de bio-encres très visqueuses et de cellules à densité élevée, ce qui est un atout majeur pour la fabrication de tissus complexes et vascularisés (122). Toutefois, la LAB présente aussi des limites. Son coût élevé et la complexité des équipements la rendent moins accessible que les autres méthodes. De plus, le choix des bio-encres compatibles est restreint, car elles doivent posséder des propriétés optiques adaptées pour absorber l'énergie du laser sans altérer les cellules. Enfin, le débit d'impression est relativement faible, ce qui limite la production de tissus de grande taille. Malgré ces contraintes, cette technologie reste prometteuse pour la fabrication de greffes tissulaires complexes et la recherche en ingénierie tissulaire (115,123).

4.1.4. Bio-impression par stéréolithographie

La bio-impression par stéréolithographie (SLA) est une technique de bio-impression qui repose sur la photopolymérisation de bio-encres sensibles à la lumière, généralement en utilisant une source de lumière UV ou visible pour durcir sélectivement des couches successives de

biomatériau. Contrairement aux méthodes d'extrusion ou de jet d'encre, la stéréolithographie fonctionne par solidification progressive d'une résine biocompatible sous l'effet d'un faisceau lumineux, permettant ainsi la création de structures complexes avec une précision micrométrique.

La bio-impression SLA utilise un réservoir de bio-encre liquide photosensible, dans lequel un faisceau lumineux (généré par un laser, une LED ou un projecteur DLP) scanne et polymérise sélectivement la couche de bio-encre correspondant à la section du modèle 3D. Une fois la première couche durcie, une nouvelle couche de bio-encre est déposée et polymérisée à son tour, permettant ainsi la construction couche par couche d'une structure tridimensionnelle.

Il existe plusieurs variantes de la bio-impression SLA :

- A. SLA classique (basée sur laser) : un laser UV balaye la surface de la bio-encre pour polymériser sélectivement les zones souhaitées (Figure 21A) (115).
- B. Digital Light Processing (DLP) : un projecteur DLP éclaire simultanément toute une couche du modèle, ce qui accélère le processus par rapport à la SLA classique (Figure 21B) (115,118).
- C. Volumetric Bioprinting : une technique émergente où une bio-encre est polymérisée en une seule étape par exposition à une lumière projetée sous plusieurs angles, permettant une impression ultra-rapide (124).

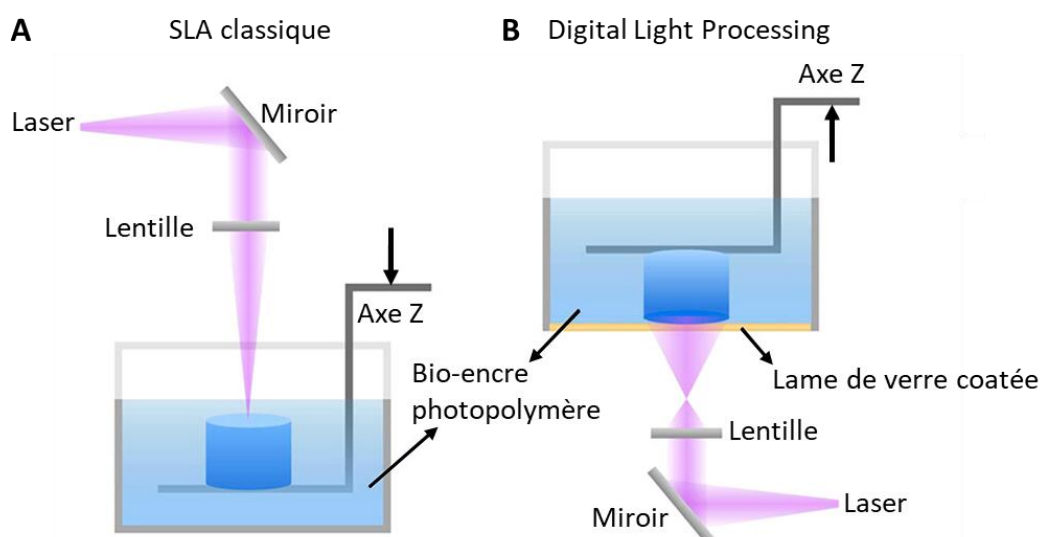


Figure 21 : Principe de la bio-impression par stéréolithographie classique et Digital Light Processing (DLP).
Adapté de Pu et al., 2024 (115)

La bio-impression SLA offre plusieurs avantages majeurs, notamment une haute résolution et une grande précision grâce à l'utilisation de la lumière pour polymériser couche par couche des bio-encre photosensibles. Cette technique permet de créer des structures complexes avec des détails fins, ce qui est essentiel pour la fabrication de tissus vascularisés ou de supports biomimétiques. De plus, la polymérisation rapide de chaque couche permet une impression relativement efficace, bien que plus lente qu'avec les approches volumiques. Un autre avantage important est la compatibilité avec divers hydrogels photosensibles, tels que le GelMA, le PEGDA ou l'alginate méthacrylé, ce qui offre ainsi un large choix de bio-encre adaptées à l'ingénierie tissulaire (125,126).

Cependant, la bio-impression par SLA présente aussi des limitations. D'abord, la phototoxicité potentielle des rayonnements UV peut nuire à la viabilité des cellules encapsulées. De plus, la nécessité d'utiliser des bio-encre photosensibles limite le choix des matériaux par rapport à d'autres techniques comme l'extrusion (115,123). Enfin, la fragilité mécanique des structures imprimées peut poser problème, notamment si le matériau imprimé ne présente pas une rigidité suffisante après polymérisation (127,128). Malgré ces limites, la bio-impression par SLA reste une technique prometteuse pour l'ingénierie tissulaire, notamment pour la fabrication de supports complexes et vascularisés.

Le Tableau 1 résume les différents paramètres des techniques de bio-impression présentées précédemment.

	Extrusion (EBB)	Jet d'encre	Laser assistée (LAB)	Stéréolithographie (SLA)
Avantages	Simple, capable d'imprimer divers biomatériaux, capacité d'imprimer des densités cellulaires élevées	Capacité à imprimer des biomatériaux à faible viscosité, vitesse de fabrication rapide, faible coût, haute résolution	Haute résolution, dépôt de biomatériaux en phase solide ou liquide	Technique sans buse, temps d'impression indépendant de la complexité, haute précision et viabilité cellulaire
Inconvénients	Applicable uniquement aux liquides visqueux	Incapacité inhérente à fournir un flux continu, mauvaise fonctionnalité pour les structures verticales, faibles densités cellulaires	Coût élevé, dommages thermiques dus à l'irritation du laser	Toxicité de la source de lumière UV pour les cellules et endommagement des cellules pendant la photopolymérisation
Rapidité	Lent	Rapide	Moyenne	Rapide
Prix	Modéré	Faible	Élevé	Faible
Capacité d'impression verticale	Bonne	Pauvre	Moyenne	Bonne

Viabilité cellulaire	40-80% (113)	80-95% (125,129)	>95% (125,130)	>90% (131)
Densité cellulaire	Élevée (131)	Basse (113,131)	Moyenne (113,130,131)	Moyenne (131)
Résolution	100 μm (113,130)	50 μm (113,125)	10 μm	20-50 μm (126,131)
Viscosité	30-6 $\times 10^7$ mPa/s (113,131)	<10 mPa/s (131)	1-300 mPa/s (113)	1-2000 mPa/s (132)

Tableau 1 : Comparaison des principaux paramètres des techniques courantes de bio-impression

4.2. Les types de biomatériaux pour la bio-impression de patchs cardiaques

Le développement des bio-encres constitue une étape déterminante dans la bio-impression. Les matériaux qui les composent doivent être biocompatibles, adaptés à l'impression et capables de préserver la viabilité cellulaire. En fonction de leur origine et de leurs caractéristiques, ils se répartissent en deux catégories principales : naturels et synthétiques.

4.2.1. Matériaux naturels

Les biomatériaux d'origine naturelle sont hautement biocompatibles et ont une bioactivité intrinsèque qui imite la MEC des cellules.

Alginate : L'alginate est un polymère naturel dérivé des algues, composé de résidus de mannuronate et de guluronate et pouvant être réticulé avec des cations divalents comme le Ca^{2+} . Bien qu'il offre un environnement favorable à la culture cellulaire, il est biologiquement inerte et nécessite l'ajout de motifs d'adhésion cellulaire (ex. peptides RGD, Matrigel) pour favoriser la génération et la maturation du tissu cardiaque. Son principal avantage en bio-impression est la possibilité d'ajuster son degré de réticulation, influençant ainsi ses propriétés mécaniques (133,134). Récemment, un patch bio-imprimé par extrusion en alginate/gélatine contenant des sphéroïdes cardiaques a démontré une amélioration significative de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (135).

- Avantages : Facile à imprimer, non toxique, biodégradable ;
- Inconvénients : Faible adhésion cellulaire, nécessite des modifications pour favoriser la prolifération cellulaire, stabilité mécanique faible.

Hyaluronane (Acide hyaluronique) : L'acide hyaluronique (AH) est un polysaccharide linéaire non sulfaté composé d'un disaccharide répétitif de β -1,4-D-glucuronique et β -1,3-N-

acétyl-D-glucosamine. Élément clé de la MEC, il joue un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire, la réparation tissulaire, la morphogenèse et l'organisation matricielle. Utilisé en clinique depuis plus de trois décennies sous différentes formes dérivées, l'AH est devenu un composant majeur dans le développement de nouveaux biomatériaux destinés à la thérapie cellulaire, à la culture cellulaire tridimensionnelle et à l'ingénierie tissulaire. Esser et al. ont proposé une méthode permettant d'imprimer directement des cardiomyocytes dérivés d'iPSC humaines dans une bio-encre à base de collagène et d'acide hyaluronique. Les tissus cardiaques imprimés, en forme d'anneaux ou de ventricules, conservent une organisation structurée des sarcomères et des contractions spontanées durables (136).

- Avantages : composant naturel de la MEC, favorise l'adhésion et la migration cellulaires, gélification rapide ;
- Inconvénients : nécessite souvent un mélange avec d'autres types de biomatériaux pour pallier à ses limitations (faible stabilité mécanique et faible réticulation naturelle).

Collagène : Le collagène, de type I ou III, est un composant clé de la MEC et se trouve naturellement dans le cœur, ce qui en fait une bio-encre privilégiée pour l'impression de tissus cardiaques (137). Il peut se présenter sous forme fibrillaire ou non fibrillaire, ce qui influence sa structure et ses propriétés mécaniques (138). La majorité des hydrogels de collagène est fabriquée à partir du collagène de type I, qui représente environ 90 % des protéines du tissu conjonctif humain. Ce collagène, constitué d'une triple hélice de chaînes polypeptidiques d'un poids moléculaire d'environ 300 kDa, s'auto-assemble à pH neutre en fibres groupées, formant une matrice qui se transforme en hydrogel en solution aqueuse. Cependant, les propriétés de ces hydrogels varient en fonction de la source du collagène et du pH de gélification, ce qui complexifie la conception, et leur instabilité post-impression nécessite une réticulation pour préserver leurs caractéristiques structurelles (139).

Récemment, un patch cardiaque innovant a été développé en combinant des nanofibres coaxiales poly(CL-co-TOSUO)/collagène obtenues par électro-filage et des CSM de moelle osseuse de rat. Après transplantation, une amélioration significative de la fonction cardiaque et de l'angiogenèse a été observée post-infarctus (140).

- Avantages : Biocompatible, biodégradable ;

- Inconvénients : faible stabilité mécanique, se gélifie seulement sous certaines conditions de pH et de température.

Gélatine (dérivé du collagène) : La gélatine, issue de l'hydrolyse partielle du collagène, est un biomatériau largement utilisé en ingénierie tissulaire cardiovasculaire à cause de sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et son faible coût. Pour renforcer ses propriétés mécaniques, elle peut être réticulée par diverses méthodes (134). Wang et al. ont proposé l'intégration de nanogouttelettes sensibles aux ultrasons dans un hydrogel GelMA (gélatine méthacryloyle) par bio-impression. *In vivo*, cette approche améliore la fonction cardiaque et la revascularisation post-infarctus chez le rat (141).

- Avantages : soluble dans l'eau, biocompatible, peu immunogène, thermosensible, biodégradable ;
- Inconvénients : faible stabilité mécanique, peu rigide.

Fibrine : La fibrine est un polymère naturel biodégradable utilisé en ingénierie tissulaire cardiovasculaire pour ses propriétés favorables à la formation de structures 3D. Dérivée du plasma sanguin, elle limite les risques immunogènes. Une fois polymérisée, la fibrine forme un réseau fibreux nanométrique qui facilite l'infiltration cellulaire, l'adhésion, la migration, la prolifération des cellules et la synthèse de MEC (132,134,142). En 2023, un travail a porté sur la bio-impression de patchs myocardiques composés d'alginate et de fibrine par extrusion. Les cardiomyocytes néonataux de rat inclus dans les patchs conservent une forte viabilité (>80 %) et expriment des marqueurs cardiaques clés, faisant de cette approche une méthode prometteuse pour la régénération myocardique (143).

- Avantages : favorise la prolifération cellulaire et l'angiogenèse ;
- Inconvénients : faible stabilité mécanique

4.2.2. Matériaux synthétiques

Les matériaux synthétiques présentent une immunogénicité réduite et offrent une meilleure définition et maîtrise de leur composition que les matériaux naturels, ce qui permet de limiter

la variabilité entre les lots. En outre, ils sont compatibles avec une large gamme de modifications physiques et chimiques, ce qui permet d'affiner leurs propriétés physiques et mécaniques en fonction du pH, de la température et de la réticulation à la lumière, conformément aux exigences expérimentales (125,126). Toutefois, ils n'offrent généralement pas les mêmes interactions cellulaires que les polymères naturels.

Polycaprolactone (PCL) : Le polycaprolactone est un polymère synthétique biodégradable, flexible et hydrophobe, largement utilisé en ingénierie tissulaire. Il se distingue par sa bonne imprimabilité en 3D, sa biocompatibilité, sa stabilité thermique et sa lente dégradation *in vivo* (environ 3 ans), ce qui le rend adapté aux implants longue durée et aux systèmes de délivrance contrôlée de médicaments (144). Toutefois, sa faible hydrophilie nécessite souvent son association à d'autres matériaux pour renforcer ses propriétés mécaniques et biologiques (145). Une étude récente a utilisé le PCL comme structure de support polymérique pour créer un tissu cardiaque à base de fibrine bio-imprimée fonctionnalisée avec des cardiomyocytes primaires isolés de cœurs de rats nouveau-nés. Les tissus imprimés ont présenté des contractions synchrones, une organisation cellulaire alignée et une réponse physiologique aux drogues (146).

- Avantages : biocompatible, biodégradable lentement, support mécanique robuste ;
- Inconvénients : dégage des sous-produits de dégradation acides, immunogénique, hydrophobe.

Polyéthylène glycol (PEG) : Le polyéthylène glycol est un polymère synthétique hydrosoluble, incolore et inodore, composé d'unités répétées d'éthylène glycol. Il existe sous forme liquide, cireuse ou solide selon sa masse moléculaire, ce qui lui confère une grande polyvalence pour de nombreux procédés de fabrication, y compris les technologies d'impression 3D. Le PEG est apprécié pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et ses propriétés mécaniques et thermiques favorables (147). Une étude présente l'utilisation innovante de l'impression 4D de PEGDA (polyethylene glycol diacrylate) par Digital Light Processing pour fabriquer des tissus cardiaques capables de changements de forme dynamiques et programmables. Les tests réalisés avec des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes humaines, des CSM et des cellules endothéliales montrent une

répartition uniforme et un alignement cellulaire optimal (148).

- Avantages : hydrosoluble, non toxique, biocompatible, biodégradable, temps de polymérisation rapide, bonne stabilité mécanique, permet la photoréticulation ;
- Inconvénients : le processus de photoréticulation peut affecter la viabilité des cellules.

Poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) : Le poly (acide lactique-co-glycolique) est un polyester copolymère constitué d'acide polylactique (PLA) et d'acide polyglycolique (PGA). Il fond à environ 175°C et est imprimé entre 200°C et 230°C. Toutefois, sa dégradation libère de l'acide lactique, ce qui peut induire une baisse du pH local, une inflammation tissulaire et une cytotoxicité. Il s'agit de l'un des biomatériaux les mieux caractérisés en matière de conception et de performance pour la délivrance de médicaments ce qui en fait un polymère largement utilisé en ingénierie tissulaire (149,150). Des chercheurs ont développé un feuillet cardiaque 3D en co-cultivant des cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC-CMs) avec des CSM issues du tissu adipeux (hADSCs) sur un support en PLGA. Cette co-culture a permis d'obtenir un tissu plus épais, mieux organisé, avec une meilleure contractilité et une fonction paracrine accrue par rapport aux hiPSC-CMs seuls. Implanté dans un modèle d'IM chez le rat, ce feuillet a amélioré la survie cellulaire, la fonction cardiaque, réduit la fibrose et favorisé l'angiogenèse, suggérant son potentiel thérapeutique pour la régénération cardiaque (151).

- Avantages : biocompatibilité, biodégradabilité contrôlée ;
- Inconvénients : rigidité élevée, ne favorise pas le remodelage des tissus, libère des sous-produits de dégradation acides, immunogène.

4.3. Considérations sur la conception des biomatériaux pour la bio-impression de patchs cardiaques

La bio-impression 3D de patchs cardiaques a montré un fort potentiel pour réparer les tissus endommagés après un IM. Diverses approches ont permis d'intégrer des cellules cardiaques, vasculaires ou souches dans des structures complexes favorisant la vascularisation, la maturation cellulaire et l'amélioration de la fonction cardiaque.

La conception de bio-encres adaptées demeure un défi central en bio-impression 3D. Les tissus biologiques présentent une grande diversité en termes de composition de MEC et de

types cellulaires, ce qui rend peu réaliste l'idée de développer une bio-encre universelle répondant à tous les besoins en ingénierie tissulaire.

Les bio-encres sont généralement évaluées selon trois critères clés : la bio-imprimabilité, la biocompatibilité et les propriétés mécaniques.

La bio-imprimabilité

L'imprimabilité d'une bio-encre correspond à sa capacité à être déposée de manière précise et reproductible pour former une structure 3D fidèle au modèle initial. Cette propriété dépend fortement des caractéristiques du matériau, notamment de sa viscosité, de sa tension de surface, du temps d'impression et du diamètre de la buse utilisée. Elle implique également une gélification rapide et une compatibilité avec les paramètres spécifiques à chaque technologie de bio-impression. Par exemple, les imprimantes à jet d'encre exigent des encres faiblement visqueuses combinées à des agents de réticulation adaptés et un comportement rhéopexique (augmentation de la viscosité après éjection), tandis que l'impression par extrusion requiert des encres plus visqueuses, thixotropes, c'est-à-dire capables de réduire leur viscosité sous l'effet d'un cisaillement, pour faciliter l'extrusion sous forme de filaments continus, généralement réticulés après dépôt. La réticulation, qu'elle soit chimique, photo-induite ou thermique, joue un rôle crucial dans la stabilisation des structures et dans l'intégration des cellules au sein de la matrice imprimée. La viabilité cellulaire, quant à elle, dépend de la méthode d'impression, des propriétés de la bio-encre et du type cellulaire utilisé (152,153).

La biocompatibilité

La biocompatibilité désigne la capacité d'une bio-encre à reproduire fidèlement le microenvironnement cellulaire, favorisant ainsi l'adhésion, la prolifération, la différenciation et les interactions entre cellules. Il s'agit d'un critère essentiel en ingénierie tissulaire, car un matériau destiné à l'impression 3D doit pouvoir interagir avec les tissus vivants sans provoquer de réponse immunitaire ou inflammatoire. Pour être considéré comme biocompatible, elle doit également être biodégradable et produire des sous-produits non toxiques. Par ailleurs, la possibilité de fonctionnaliser le matériau est importante afin d'en optimiser les propriétés selon son application finale (154,155).

Propriétés structurelles et mécaniques

Les propriétés mécaniques des bio-encres doivent assurer une solidité suffisante pour garantir la stabilité des structures imprimées tout au long de la culture *in vitro* et après implantation. Elles doivent résister à la dégradation progressive et aux contraintes mécaniques du microenvironnement tissulaire. En l'absence de ces qualités, l'implant risque de perdre en cohésion, compromettant l'efficacité thérapeutique. Toutefois, les caractéristiques nécessaires à une impression fiable, telles que la viscosité, la densité ou la résistance, s'avèrent souvent peu compatibles avec un environnement favorable à la survie cellulaire, qui exige plutôt souplesse, porosité et perméabilité pour permettre la migration, l'expansion et l'oxygénation des cellules. Outre ces critères, d'autres paramètres comme le module de stockage (G') et le module de perte (G'') influencent également la qualité d'impression. Un ratio G'/G'' élevé indique un comportement plus élastique et une meilleure fidélité, cette relation dépendant fortement du type de polymère utilisé. Les exigences rhéologiques d'une bio-encre varient selon la technologie d'impression choisie (153).

Le choix des matériaux repose donc sur leur capacité à reproduire les propriétés mécaniques des tissus cibles, depuis l'élasticité des tissus mous jusqu'à la rigidité des tissus osseux. Pour répondre aux besoins structurels temporaires, des matériaux dits « sacrificiels » sont couramment utilisés : ils permettent de maintenir une architecture complexe lors de l'impression ou soutiennent la structure jusqu'à ce que les matériaux biologiques ou les cellules assurent leur propre cohésion. Ces matériaux doivent néanmoins être sélectionnés avec précaution, car ils peuvent influencer la biocompatibilité globale de l'encre et modifier le profil de dégradation, avec des conséquences possibles sur la réponse de l'hôte (152).

4.4. Recommandations pour avoir un produit bio-imprimé de grade clinique

La conception de biomatériaux pour des applications cliniques ou précliniques doit répondre à des critères rigoureux dès les premières étapes de développement. Pour être efficaces en tant qu'outils d'évaluation pharmacologique ou dispositifs médicaux, ces matériaux doivent allier polyvalence (notamment en termes de rigidité et de composition), simplicité d'utilisation, facilité de fabrication, conformité réglementaire et viabilité économique (156). En ingénierie tissulaire, les bio-encres doivent en outre présenter une biocompatibilité exemplaire, une

inertie biologique, une stabilité mécanique adaptée et favoriser les interactions cellulaires nécessaires à la régénération des tissus (153). L'évaluation de ces critères repose sur des tests *in vitro* et *in vivo*, encadrés par des normes comme l'ISO/FDIS 10993-1 (157), ainsi que par les recommandations des autorités réglementaires comme la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis ou l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) en France.

Un enjeu majeur dans la transposition clinique réside dans la stérilisation des biomatériaux, indispensable mais susceptible d'altérer les propriétés des hydrogels naturels largement utilisés dans les bio-encres. Le choix de la méthode (autoclavage, filtration, oxyde d'éthylène, rayonnement gamma, ...) doit donc être soigneusement adapté à la formulation. Par ailleurs, contrairement à l'industrie des dispositifs médicaux traditionnels, où les matériaux sont standardisés et certifiés pour un usage clinique, les bio-encres et biomatériaux utilisés en bio-impression sont rarement disponibles en qualité médicale. L'utilisation fréquente de composants d'origine animale, présents dans certains milieux de culture ou bio-encres, soulève des risques immunitaires et réglementaires, ce qui impose une attention particulière lors de l'optimisation des protocoles de fabrication pour garantir une qualité clinique (158,159).

Le manque de normes spécifiques applicables aux techniques de bio-impression limite aujourd'hui la comparabilité des études et freine leur transposition clinique. Pour y remédier, certaines approches proposent des protocoles d'évaluation reproductibles et accessibles, combinant l'analyse de la viabilité, de la prolifération et du phénotype cellulaire. Ces outils pourraient faciliter la présélection des formulations, réduire les coûts expérimentaux et favoriser la standardisation des procédés (155).

5. Présentation du projet de thèse

Dans le cadre de cette thèse CIFRE, nous avons exploré une approche innovante de thérapie régénérative dans un modèle de dysfonction ventriculaire gauche ischémique pour le traitement de l'IC chronique, une pathologie pour laquelle de nouvelles options thérapeutiques restent nécessaires. L'objectif de ce projet a donc été d'évaluer le potentiel des CSM et de leurs VE, en les combinant à un biomatériau à base de collagène bio-imprimé en 3D sous forme de patch cardiaque. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'entreprise Poietis, dont

l'expertise et la technologie de bio-impression ont permis de développer un dispositif compatible avec les exigences d'une transposition clinique. Dans cette optique, nous avons fait le choix de sources cellulaires plus accessibles, comme les CSM dérivées de muscle squelettique, et plus reproductibles, comme les CSM dérivées de cellules souches pluripotentes induites.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les CSM et leurs VE *in vitro* afin d'évaluer leur intérêt thérapeutique dans le contexte de l'IC. Puis, nous avons conçu et mis au point un hydrogel de collagène bio-imprimé, pouvant être fonctionnalisé avec les CSM ou leurs VE. La technique de bio-impression utilisée a permis de mettre en place un procédé de fabrication reproductible, automatisable et conforme aux exigences des applications cliniques. Par ailleurs, cette technologie offre, par la suite, la possibilité d'optimiser et de personnaliser les patches, en fonction des besoins spécifiques de chaque patient.

L'efficacité thérapeutique de ces patches, avec ou sans agent actif, a ensuite été évaluée dans un modèle de dysfonction ventriculaire gauche post-infarctus chronique chez le rat. Cette évaluation reposait sur une approche multimodale combinant échocardiographie, analyses histologiques et transcriptomiques.

Ce travail s'inscrit à l'interface de l'ingénierie tissulaire, de la thérapie cellulaire et des technologies de bio-impression, avec pour ambition de proposer une solution innovante, personnalisable et transposable à la clinique. En combinant des approches *in vitro*, une modélisation *in vivo* et une analyse des mécanismes moléculaires, ce projet met en lumière les effets bénéfiques des CSM d'une origine encore peu étudiée (le muscle squelettique) et l'intérêt d'un biomatériau comme support pour optimiser leur efficacité thérapeutique.

Matériel & Méthodes

1. Production des CSM et des VE

1.1. Expansion des CSM dérivées d'iPSC

Les CSM dérivées d'iPSC cryopréservées (iCell® Mesenchymal Stem Cells, FUJIFILM Cellular Dynamics International, Inc, WI, États-Unis) sont décongelées etensemencées à une densité de 35,000 cellules/cm² dans du milieu de culture RoosterNourish™-CSM-XF (RoosterBio, Frederick, MD, États-Unis) supplémenté avec 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis). Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Le milieu est changé tous les 6 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent 80% de confluence (passage 0). Les cellules sont ensuite détachées par de la trypsine-EDTA (ThermoFisher, Waltham, MA, États-Unis) puis collectées et réensemencées à une densité de 5,000 cellules/cm² jusqu'au passage 2 afin de constituer une banque.

1.2. Expansion des CSM de muscle squelettique humain

Les CSM dérivées de muscle squelettique humain ont été fournies par l'entreprise REVATIS (Liège, Belgique), qui a développé une méthode de prélèvement peu invasif utilisant une aiguille de microbiopsie. Ce procédé permet de prélever entre 15 et 20mg de tissu par une simple piqûre. Les échantillons de tissu sont ensuite coupés en dés, conservant la structure tridimensionnelle du tissu parent, puis cultivés *in vitro*. Les explants de muscle squelettique reproduisent ainsi l'environnement *in vivo* du muscle en régénération et stimulent la migration ainsi que la division des cellules souches. Les cellules progénitrices se développent à partir des biopsies. La fraction intéressante de la population cellulaire est ensuite isolée par centrifugation dans un gradient de densité et étendue jusqu'à l'obtention du nombre requis de cellules.

Les CSM cryopréservées sont décongelées etensemencées à une densité de 35,000 cellules/cm² dans du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell, Vancouver, BC, Canada) supplémenté avec 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich). Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Le milieu est changé le lendemain de la décongélation, puis tous les 2 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent 80% de confluence (passage 4). Les cellules sont ensuite détachées par du TrypLE™ Express (ThermoFisher) puis collectées et réensemencées à une densité de 5,000 cellules/cm²

jusqu'au passage 2 afin de constituer une banque.

1.3. Caractérisation des CSM

1.3.1. Expression de marqueurs spécifiques

Les CSM sont caractérisées par cytométrie en flux avec les antigènes de surface CD90, CD105 et CD73, marqués respectivement avec par les anticorps FITC anti-human CD90 (clone 5A10, Biolegend, San Diego, CA, États-Unis), Brilliant Violet 421™ anti-human CD105 (clone 43A3, Biolegend), PE anti-human CD73 (clone AD2, Biolegend). L'absence des marqueurs hématopoïétiques CD14, CD45, CD31 et HLA-DR a aussi été vérifiée avec les anticorps BV786 Mouse Anti-Human CD14 (clone M5E2, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, États-Unis), Alexa Fluor® 700 anti-human CD45 (clone 2D1, Biolegend), APC anti-human CD31 (clone WM59, Biolegend), PE/Cyanine7 anti-human HLA-DR (clone L243, Biolegend).

Les contrôles négatifs sont des CSM non marquées ou des cellules mononuclées du sang périphérique exprimant les marqueurs hématopoïétiques.

Les iMSC ont également été caractérisées par leur expression des facteurs de transcription liés à la pluripotence Nanog, Sox2 et Oct3/4 respectivement marqués par les anticorps anti-Sox2-PE (clone REA320, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), anti-Nanog-Vio B515 (clone REA314, Miltenyi) et anti-Oct3/4-APC (clone REA622, Miltenyi). Ce marquage a été réalisé avec le kit Transcription Factor Staining Buffer Set (Miltenyi) selon les recommandations du fournisseur.

Les contrôles négatifs sont des iMSC non marquées ou des iPSC exprimant les facteurs de transcriptions liés à la pluripotence.

Les acquisitions ont été réalisées sur le cytomètre LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences) et les résultats analysés sur le logiciel FlowJo v10.10.0 (BD Biosciences).

1.3.2. Différenciation trilinéage

La capacité de différenciation des CSM en adipocytes, chondrocytes et adipocytes a été évaluée avec les kits suivants : StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher), StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher), StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher). Ces kits ont été utilisés selon les recommandations du fournisseur.

1.3.3. Immunogénicité

La capacité d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les CSM a été évaluée par cytométrie en flux.

Le test de réaction lymphocytaire mixte (MLR) a été réalisé conformément à Nicotra et al. (160). Le test MLR a été réalisé sur les mdMSC et les iMSC après une stimulation de 48 heures avec l'interféron γ (IFN γ). Brièvement, 3×10^5 cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) provenant de 10 donneurs sains et marquées avec le kit de prolifération cellulaire violet CellTrace™ (Invitrogen) ont été co-cultivées avec des CSM à un ratio 0:1 (contrôle), 1:1, 1:3, 1:5, 1:10, 1:30, 1:100 et 1:300 (CSM:PBMC).

Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture composé de RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, HEPES (ThermoFisher), 10% de sérum humain A/B (Eurobio, Les Ulis, France), 1% d'Amphotéricine B/Pénicilline/Streptomycine (ThermoFisher), et 10 UI/mL d'Héparine (PanPharma, Luitré, France) à 37°C, 5% de CO₂ pendant 7 jours. Au jour 4, 50 μ L de milieu de culture ont été ajoutés. Au jour 7, les cellules ont été marquées avec 5 μ L d'anticorps humains anti-CD3 PE (BD Biosciences), anti-CD45 FITC (BD Biosciences) et du colorant de viabilité 7-AAD (Beckman Coulter, Villepinte, France) pendant 15 min à 4°C, à l'abri de la lumière. Les cellules ont été lavées dans une solution tampon (PBS) avant l'acquisition sur le cytomètre de flux Attune NxT™ Thermofisher® et les analyses à l'aide du logiciel Attune NxT™.

1.4. Production et isolement des VE

1.4.1. Production du milieu conditionné et isolation des VE

Pour obtenir le milieu conditionné, les iMSC sont mises en culture jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire confluent à 80%. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X et du milieu de collecte RoosterCollect™-EV (RoosterBio) est ajouté dans la flasque. Les cellules sont ensuite placées à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 72h puis le milieu conditionné est récupéré et clarifié par centrifugation à 400g, 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté et à nouveau clarifié à 2000g, 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite

aliquoté et stocké à -80°C.

Les milieux conditionnés des mdMSC sont obtenus directement auprès de la société REVATIS.

Les VE sont isolées du milieu conditionné par ultracentrifugation à 100.000g, 4°C pendant 16h.

Les culots obtenus sont resuspendus dans 100µL de PBS 1X filtré à 0,2µm puis aliquotés et stockés à -80°C.

1.4.2. Quantification par Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Les tailles et concentrations des VE sont déterminées par NTA avec le NanoSight LM14 (Malvern Panalytical, Malvern, UK). Cette technologie s'appuie sur la diffusion de la lumière d'un laser et le mouvement brownien des particules en suspension pour évaluer leur concentration et la distribution des tailles (Figure 22).

Chaque échantillon est mesuré au moins 3 fois et chaque mesure inclut 5 vidéos de 60 secondes capturées à 27 °C avec un niveau de caméra de 15 et un seuil de 4.

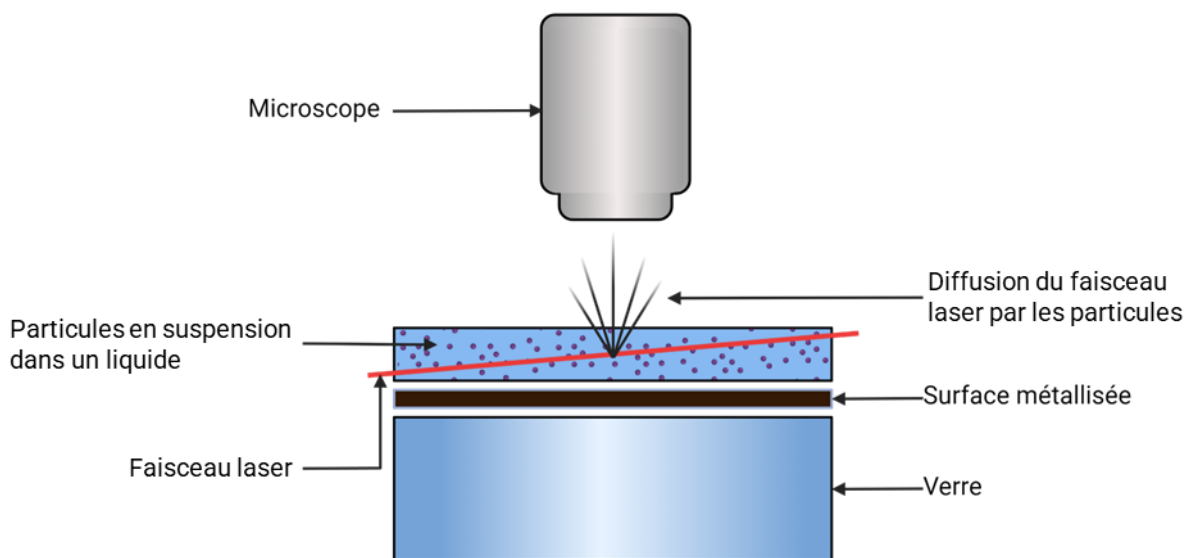


Figure 22 : Schéma explicatif du fonctionnement du NTA adaptée de Filipe et al., 2010 (161)

1.4.3. Expression de marqueurs spécifiques

Les VE sont caractérisées par la présence de marqueurs spécifiques à leur surface par cytométrie en flux avec le MACSPlex Exosome Kit (Miltenyi) comme résumé sur la Figure 23.

Ce kit permet la détection et la caractérisation des VE en utilisant 37 épitopes de surface différents.

Les VE sont incubées avec un mélange de billes de capture distinctement marquées par intensité de fluorescence. Chaque population de billes est pré-conjuguée avec un anticorps ciblant un marqueur spécifique des VE. Le mélange est incubé pendant une nuit à 4°C. Après l'incubation, le mélange est lavé avec 200µL de MACSPlex Buffer, puis centrifugé à 300g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et les billes sont resuspendues dans 100µL de tampon. Un réactif de détection est ensuite ajouté pendant 1h. Ce réactif est un cocktail d'anticorps anti-tétraspansines (CD9, CD63, CD81) conjugués à un fluorochrome APC. Après deux étapes de lavage supplémentaires pour éliminer l'excès de réactif de détection, les billes sont resuspendues dans du tampon et analysées sur un cytomètre LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences). Les résultats analysés sur le logiciel FlowJo v10.10.0 (BD Biosciences).

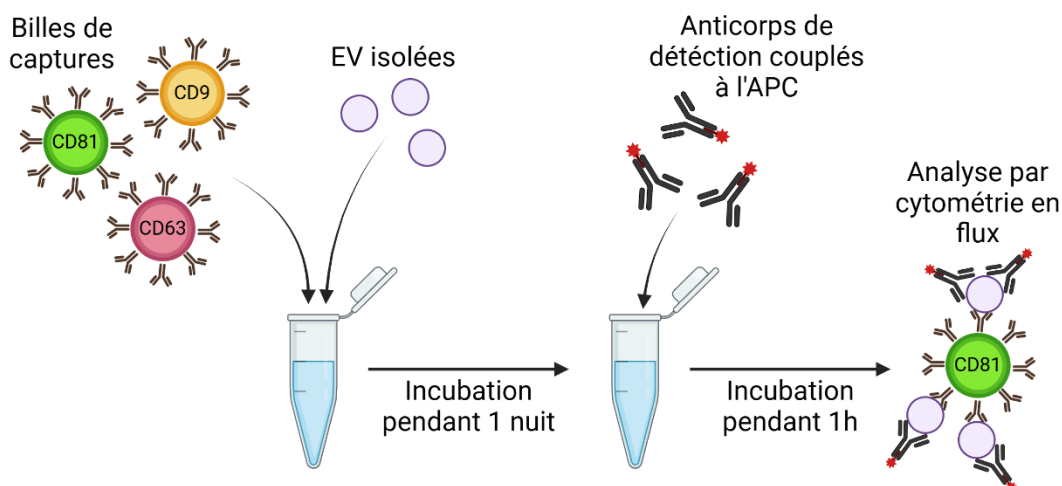


Figure 23 : Schéma explicatif du protocole du MACSPlex Exosome Kit pour caractériser les VE

1.5. Tests d'évaluation du potentiel thérapeutique *in vitro*

La bioactivité de chaque agent thérapeutiques (CSM et VE) a été évaluée dans différents test *in vitro* afin de déterminer lequel sera utilisé dans la partie *in vivo* du projet.

Plusieurs paramètres ont été choisis afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des CSM et des VE et de préciser leurs mécanismes d'actions.

Tout d'abord, leur capacité à améliorer le processus d'angiogenèse a été mesuré grâce à un

test de cicatrisation. Ensuite, leurs effets protecteurs sur des cellules soumises à un stress pro-apoptotique a été mis en évidence grâce à un test de mesure de l'activité métabolique. Leur aptitude à diminuer et/ou à stabiliser l'installation de la fibrose dans un environnement pro-fibrotique a été analysé avec un test de modulation et de la fibrose. Et enfin, leur potentiel à réduire la réaction inflammatoire a été mesuré avec un test de modulation de l'inflammation.

1.5.1. Test de cicatrisation

Des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC, Promocell, Heidelberg, Allemagne) sont utilisées à passage précoce (passage 2 à 6) et sontensemencées à 40.000 cellules/puits dans un insert de culture 2 puits (Ibidi GmbH, Munich, Germany) (Figure 24) d'une plaque 24 puits avec du milieu Endothelial Cell Growth medium (Promocell) supplémenté avec 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich). Les HUVEC sont placées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5 % de CO₂.

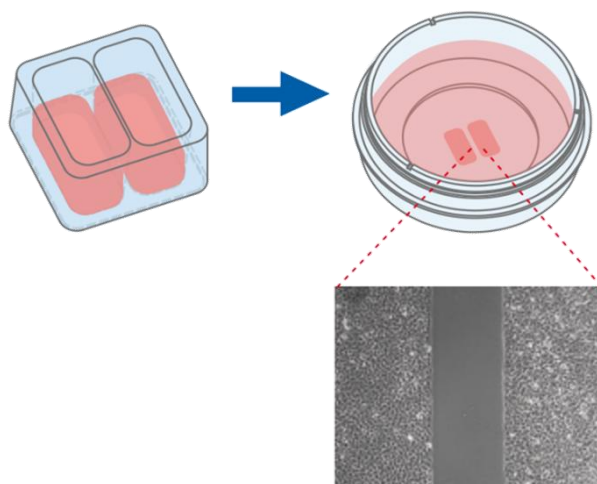


Figure 24 : Schéma explicatif de l'utilisation des inserts de culture (Ibidi)

En parallèle, les CSM sontensemencées à 100.000 ou 300.000 cellules/puits dans des Transwell® de 6,5 mm avec membrane en polycarbonate à pores de 0,4 µm (Corning, Kennebunk, ME, USA) dans du milieu de culture RoosterNourish™-CSM-XF (RoosterBio) pour les iMSC et du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell) pour les mdMSC. Les cellules sont placées à l'incubateur 37°C, 5%de CO₂ pendant 24h.

Après 24h, les cellules sont confluentes et les inserts des HUVEC sont retirés afin de créer un espace défini de 500 µm sans cellules. Les puits sont remplis avec différents milieux selon les conditions :

- Contrôle positif : milieu complet (MC : milieu basal avec supplément)
- Contrôle négatif : milieu pauvre (MP : milieu basal)
- Conditions d'intérêt :
 - VE : MP supplémenté avec des VE isolées après 72h de culture des CSM mères dans du milieu pauvre
 - CSM : MP avec transwell contenant les CSM

Une photo de chaque puits est réalisée à T0 puis la plaque est remplacée dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO₂. Après 24h, de nouvelles photos sont faites de chaque puits.

L'évolution de la cicatrisation est mesurée en comparant la surface de la cicatrice à T0 et à T24 avec l'équation ci-dessous :

$$\text{Pourcentage de cicatrisation (\%)} = \frac{\text{Surface à T0} - \text{Surface à T24}}{\text{Surface à T0}} \times 100$$

1.5.2. Test de viabilité cellulaire

Un coating de gélatine 0,1% est réalisé dans les puits d'une plaque 24 puits. Des HUVEC (Promocell) sont utilisées à passage précoce (passage 2 à 6) et sontensemencées à 90.000 cellules/puits avec du milieu Endothelial Cell Growth medium (Promocell) supplémenté avec 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich).

En parallèle, les CSM sontensemencées à 100.000 ou 300.000 cellules par puits dans des Transwell® de 6,5 mm avec membrane en polycarbonate à pores de 0,4 µm (Corning) dans du milieu de culture RoosterNourish™-CSM-XF (RoosterBio), 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich) pour les iMSC et du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell), 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich) pour les mdMSC. Les cellules sont placées à l'incubateur 37°C, 5% de CO₂ pendant 24h.

Après 24h, les HUVEC sont confluentes et le milieu est remplacé par du milieu pauvre (sans supplément) avec ajout de 0,05µM de staurosporine (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). La plaque est placée dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ pendant 1h puis les puits sont délicatement rincés deux fois avec du milieu pauvre. Les puits sont remplis avec différents milieux selon les conditions :

- Contrôle positif : milieu complet (milieu basal avec supplément)

- Contrôle négatif : milieu pauvre (milieu basal)
- Conditions d'intérêt :
 - VE : milieu pauvre supplémenté avec des VE isolées après 48h de culture des CSM mères dans du milieu pauvre
 - CSM : milieu pauvre avec transwell contenant les CSM

La plaque est incubée pendant 24h à 37°C puis le kit de comptage de cellules – 8 (CCK8) (Sigma-Aldrich) est ajouté dans chaque puit à la dilution 1/10 et la plaque est replacée à l'incubateur 37°C pendant 3h. La quantité de formazan (colorant orange) produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes (Figure 25). La viabilité cellulaire est ensuite mesurée à une absorbance à 450 nm par un spectrophotomètre SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Allemagne) et le logiciel d'analyse de données MARS.

Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle négatif (milieu pauvre).

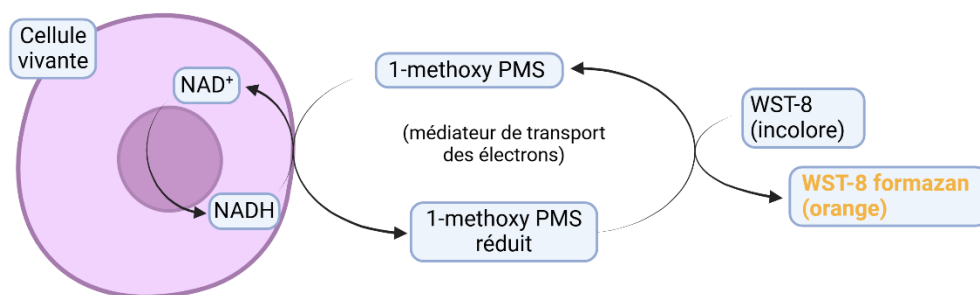


Figure 25 : Principe du kit CCK-8 pour mesurer la viabilité cellulaire

1.5.3. Test de modulation de la fibrose

1.5.3.1. Culture cellulaire

Ce protocole a été mis en place et optimisé grâce au protocole de Palano et al (162).

Des fibroblastes cardiaques humain (HCF) (Promocell) sont décongelés et mis en culture à passage précoce (passage 1 à 5) dans du milieu de culture Fibroblast Growth Medium 3 (Promocell) supplémenté avec 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich) à 37°C, 5% de CO₂ jusqu'à obtenir une confluence de 80%. Ensuite, les HCF sontensemencés dans une plaque 24 puits à une densité de 30.000 cellules/cm² et incubés à 37°C, 5% de CO₂. Après 24h, le milieu de culture est remplacé par un milieu de déprivation (MD) contenant du DMEM, haute teneur en glucose, supplémenté avec 0,5% de sérum de veau fœtal (FBS) (Biosera, Cholet, France), 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich) et 1% de

solution d'acides aminés non indispensables MEM (100X) (Gibco). Les cellules sont replacées à l'incubateur 37°C, 5% de CO₂ pendant 24h. Après déprivation, le milieu de culture est remplacé par un milieu de stimulation (MS) contenant le MD avec 100µM d'acide L-ascorbique 2-phosphate (L-asc) (Sigma-Aldrich), 10ng/mL de TGF-β1 humain recombinant (R&D Systems) et 100 µg/mL sulfate de dextran (DxS) (Sigma-Aldrich). Les cellules sont maintenues à 37°C, 5% de CO₂ pendant 24h.

En parallèle, les mdMSC sontensemencées à 100.000 ou 300.000 cellules par puits dans des Transwell® de 6,5 mm avec membrane en polycarbonate à pores de 0,4 µm (Corning) dans du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell), 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich). Les cellules sont placées à l'incubateur 37°C, 5% de CO₂ pendant 24h.

Après stimulation, les puits HCF et les transwells contenant les mdMSC sont rincés avec du MD. Les transwells sont ensuite transférés dans les puits pour permettre un contact indirect entre les HCF et les mdMSC pendant 24h à 37°C, 5% de CO₂. Finalement, les transwells sont retirés et les HCF sont marqués par immunofluorescence ou détachés avec de la trypsine-EDTA (ThermoFisher) pour être collectés sous forme de culots secs et stockés à -80°C dans l'objectif de réaliser des qPCR.

Le terme « non traités » fait référence aux HCF en culture cellulaire normale, « non stimulés » fait référence à la condition de contrôle où les HCF sont seulement déprivées en sérum, « stimulés » fait référence aux cellules déprivées et stimulées avec le MS et « mdMSC » fait référence aux cellules déprivées et stimulées puis mise en contact indirect avec les mdMSC.

Le protocole est résumé dans la Figure 26.

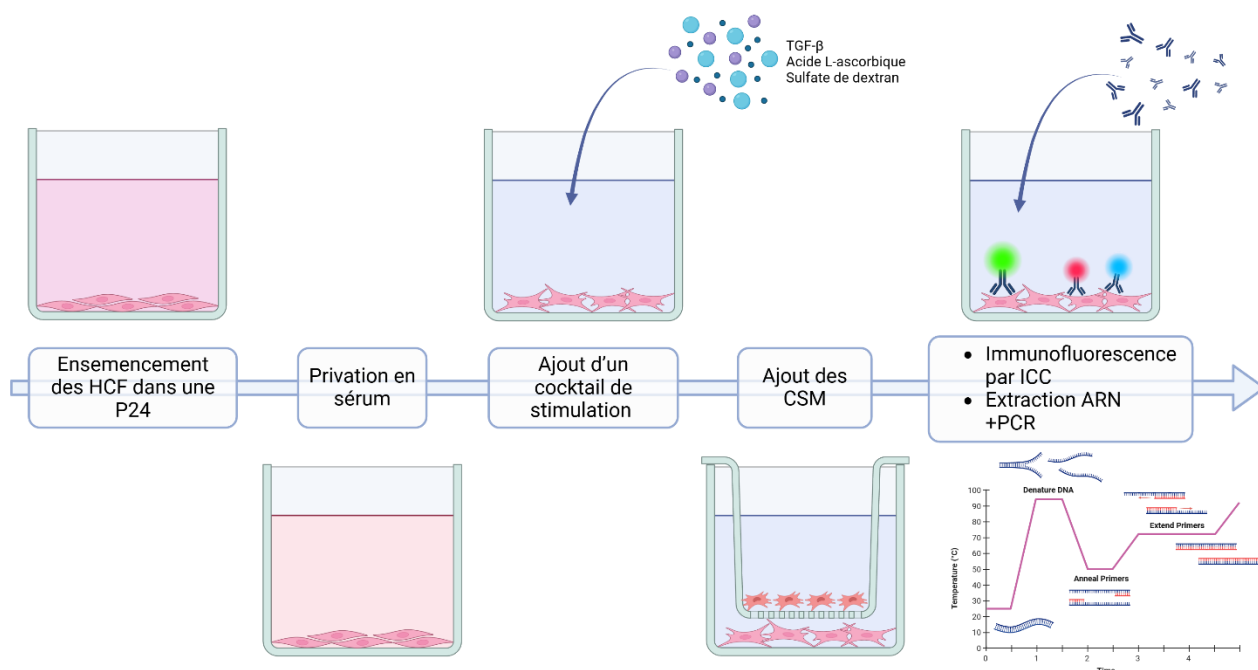


Figure 26 : Schéma du protocole de culture cellulaire du test de modulation de la fibrose

1.5.3.2. Immunofluorescence par Immunocytochimie (ICC)

Les HCF sont fixés par ajout de paraformaldéhyde (PFA) 2% dans le milieu de chaque puits et incubés à 37°C pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X froid puis perméabilisées et bloquées avec une solution de PBS 1X contenant 10% de FBS (Biosera) et 0,2% de TritonX-100 (ThermoFisher) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire monoclonal anti- α -actine de muscle lisse (clone 1A4, Sigma-Aldrich) à 4°C toute la nuit. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS 1X froid puis incubées avec l'anticorps secondaire Goat anti-Mouse IgG – Alexa Fluor™ 488 (ThermoFisher) et le colorant pour membrane CellMask™ Deep Red (ThermoFisher) pendant 1h à température ambiante (TA). Les noyaux sont contre-colorés avec du DAPI (Sigma-Aldrich) pendant 3 minutes à TA.

Les images sont prises sur un microscope inversé Leica DM6000 (Leica, Wetzlar, Allemagne) et analysées avec le logiciel ImageJ.

1.5.3.3. Extraction d'ARN, RT-PCR et PCR

L'ARN est extrait des culots secs avec le kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. La concentration et la pureté de l'ARN obtenu sont quantifiés par spectrophotométrie avec le NanoDrop™ One (ThermoFisher) puis l'ARN est

rétrotranscrit en acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) avec le kit QuantiTect Rev. Transcription (Qiagen).

Les amplifications en chaîne par polymérase quantitatives (qPCR) sont réalisées dans des plaques 96 puits sur les ADNc obtenus avec les réactifs SYBR® Green (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) et le thermocycleur StepOnePlus System (ThermoFisher). Le gène de ménage utilisé pour la normalisation est *GAPDH*. Les amorces ont été conçues sur le logiciel Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA). Leurs séquences et leurs températures d'hybridation (annealing temperature) sont répertoriées dans le Tableau 2.

Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle négatif (HCF stimulés).

Espèce	Gène	Sens	Séquence (5' vers 3')	Température d'hybridation	Rôle
Humain	<i>COL1A1</i>	Forward	GCACCTGCCGTGACCTCAAGAT	64,2°C	Fibrose
		Reverse	TGGCCGCCATACTCGAACTGGAAT		
	<i>COL3A1</i>	Forward	ATCAGGCCAGTGGAAATGTAAAGA	59,8°C	Fibrose
		Reverse	TCACAGCCTTGCGTGTTCGATAT		
	<i>FN1</i>	Forward	TCCCATTATGCCGTTGGAGATGAG	59,8°C	Fibrose
		Reverse	TCATCTGCCCATTTTCTCCCTGAC		
	<i>GAPDH</i>	Forward	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAG	60°C	Gène de ménage
		Reverse	TCGCCCCACTTGATTTTGCAGG		
	<i>MMP2</i>	Forward	GCGAGTGGATGCCGCCTTTAACTG	61,5°C	Dégradation de la matrice / Remodelage cardiaque
		Reverse	GTCCACGACGGCATCCAGGTTATC		
	<i>POSTN</i>	Forward	GGAGAAACGGTGCGATTACATAT	59,4°C	Remodelage cardiaque
		Reverse	AGAGCATTTTGTCCCGTATCAGA		

Tableau 2 : Liste des amorces humaines pour les qPCR

1.5.4. Test de modulation de l'inflammation

Des mdMSC sontensemencées à 300.000 cellules par puits dans des Transwell® de 6,5 mm avec membrane en polycarbonate à pores de 0,4 µm (Corning) dans du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell), 10% de FBS et 1% de solution antibiotique antimycosique (Sigma-Aldrich). Les cellules sont placées à l'incubateur 37°C, 5% de CO2 pendant 24h. Le lendemain, des monocytes THP-1 sontensemencés à 100.000 cellules/cm² dans une plaque 24 puits contenant du milieu complet RPMI 1640 supplémenté avec 10% de FBS et 1% de PSA. Une solution de lipopolysaccharide (LPS) est ajoutée à tous les puits, à l'exception du contrôle positif MC, afin d'obtenir une concentration finale de 1 µg/mL. Les transwells contenant les mdMSC sont rincés avec du milieu RPMI 1640 et sont ensuite transférés dans les puits contenant les THP-1 stressés au LPS pour permettre un contact indirect entre les THP-1 et les mdMSC pendant 24h à 37°C, 5% de CO2. Après l'incubation, les

surnageant sont récupérés et centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants obtenus sont aliquotés et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

La concentration de la cytokine pro-inflammatoire facteur de nécrose tumorale (TNF α) et de la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 (IL-10) est ensuite évaluée par un test ELISA (Biotechne, MN, États-Unis) utilisé selon les recommandations du fournisseur. La densité optique est lue à 450nm et à 570nm sur un spectrophotomètre.

2. Design et fabrication du patch cardiaque de grade clinique

2.1. Cahier des charges du patch cardiaque

Le cahier des charges du patch cardiaque repose sur trois critères fondamentaux :

- **Propriétés mécaniques :**
 - Le patch doit présenter une bonne cohésion.
 - Il doit être suffisamment élastique pour s'adapter aux mouvements cardiaques sans se rompre, ni entraver les contractions.
 - Sa manipulabilité doit permettre une implantation facile.
- **Propriétés physico-chimiques :**
 - Il doit être biocompatible pour éviter toute réaction indésirable.
 - Il doit être biodégradable, afin de se résorber progressivement après implantation.
 - Il doit répondre aux exigences réglementaires applicables aux produits à visée clinique.
- **Fonctionnalisation :**
 - Il doit être conçu pour permettre l'incorporation de cellules ou de VE.

Basé sur l'expérience de Poietis, le biomatériau choisi pour la fabrication du patch est le collagène de type 1. Afin de préciser les critères de fabrication du patch, un profil cible de produit (ou Target Product Profile TPP) a été mis en place et est présenté dans le Tableau 3. Cet outil de planification est régulièrement utilisé dans le développement de produits pharmaceutiques, biologiques ou médicaux. Il sert de feuille de route pour orienter la conception, le développement, l'évaluation et la stratégie réglementaire d'un produit.

	Profil minimal acceptable	Profil du produit cible	Profil optimal	Sources
Indication primaire du produit	- Cardiopathie ischémique (augmentation de la prévalence et peu de solutions thérapeutiques, pas de réparations ou revascularisations possibles) - Insuffisance cardiaque réfractaire aux traitements médicaux (Standard société européenne de cardiologie GDT guideline directed therapy)? - Critère Fraction d'éjection (FE) < 35-40 % - Hors indication : Cardiopathies non ischémiques, cardiomyopathies liées à la maladie de Duchenne, amylose / liés à un problème valvulaire ou hypertension artérielle / les cardiopathie rythmiques			
Proposition de valeur	1. Pour les cas réfractaires non éligibles à la transplantation ou assistance mécanique → impasse thérapeutique ou stade 3 2. Pourrait permettre de retarder le recours à la transplantation ou à l'assistance mécanique en maintenant les patients au stade 3 voir améliorer au stade 2 3. NYHA II : insuffisance cardiaque pouvant être ciblée ? → transplantation / assistance mécanique indiquées partir de 4 (intérêt de reporter la transplantation dans le temps) 4. Autres produits en développement : Bio-vat (W. Zimmermann) engineered heart tissue (en collagène) les patchs sont cousus sans lambeaux péricardiques / Sawa (au Japon)			
Population de patient	Adulte (18-80 ans), majorité des patients 50-70 ans			
Procédure clinique	Fixation par suture	- Cadre / ou Compresse de tachosil® (fibrinogène thrombine) - Fixation au cœur par hémostase - Mini-thoracotomie gauche (pause sur le ventricule gauche)	Vérification fonctionnelle préclinique : modèle cochon	
Administration	Pose du patch sur la compresse tachosil			
Disponibilité	IC chronique, pas urgent			
Mode de distribution aux cliniciens	Patch manipulable à plat (avec papier d'ancrage)			
Stabilité	Produit frais 4 heures post libération	Produit frais (24 – 48h)	Produit congelé (stabilité plusieurs mois)	
Composition		- Biomatériel : collagène 4 mg/mL - Pas autologue - Source cellules : MSC IPS / MSC muscle		
Posologie	Forme	Carré / Rectangulaire		
	Surface		40cm ²	8*8 mm ou 6*8 mm (dimensions précliniques sur rat?)
	Epaisseur	1mm	2mm	
Mécanisme d'action		- Sécrétome des VE ou MSC ? - Effet prolongé grâce au biomatériau ? - Effet sur les macrophages → transforment les macrophages pro-inflammatoires en macrophages anti inflammatoires ? - Effet sur la fibrose chronique ?		
Critère d'évaluation de la sécurité		Test d'Immunogénicité		

Tableau 3 : Profil cible de produit du patch cardiaque

2.2. Impression et fonctionnalisation du patch cardiaque par les CSM

2.2.1. Formulation du collagène

Le biomatériel utilisé est une solution de collagène bovin de type 1 acido-soluble (Symathèse, Chanopost, France) à 5mg/mL.

La formulation développée par Poietis pour préparer le collagène contient : un donneur d'ions concentré (DPBS 10X), une base forte (NaOH), un diluant (eau pour préparation injectable PPI) et la solution mère de collagène acide, mélangés respectivement dans cet ordre. La concentration finale de collagène est de 4mg/mL.

Réactifs	Formule volume
DPBS 10X	$= \frac{\text{volume final}}{10}$
NaOH	$= \text{volume collagène} \times \text{facteur NaOH}$
Eau PPI	$= \text{volume final} - \text{volume NaOH} - \text{volume collagène}$
Collagène	$= \frac{[\text{collagène final}] - \text{volume final}}{[\text{collagène initial}]}$

Tableau 4 : Formule de calcul des volumes des réactifs de la bio-encre de collagène

Le facteur NaOH est calculé pour ajuster le pH de la formule de collagène entre 7,0 et 7,5. L'ajustement de la formulation se fait sur un mode « essai-erreur », expliqué dans la Figure 27.

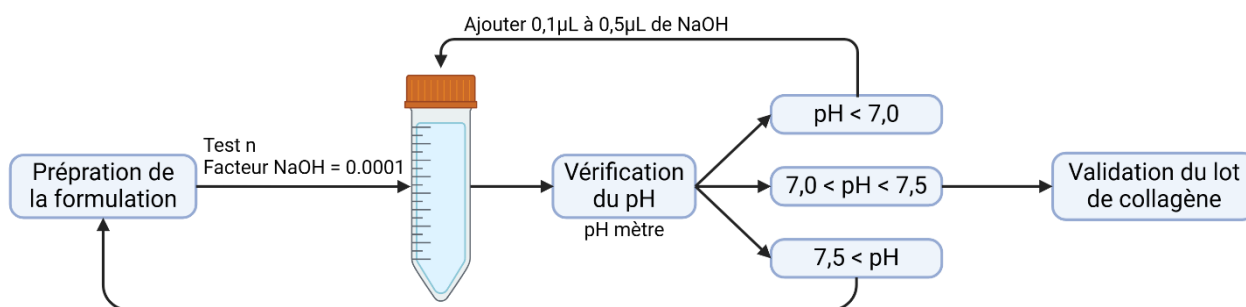


Figure 27 : Schéma du protocole d'ajustement de la formulation de collagène

2.2.2. Fonctionnalisation du collagène

Les mdMSC sont mises en culture une semaine avant leur bio-impression. Les cellules sont ensuite détachées par du TrypLE™ Express (Thermofisher) et comptées sur cellule de Malassez. Les cellules sont centrifugées et resuspendues dans 300µL de PBS 1X à une concentration de 20×10^6 cellules/mL. Les cellules sont ajoutées dans la solution de collagène (100µL/couche).

2.2.3. Bio-impression des patches cardiaques

La bio-impression des patches se fait sur une bio-imprimante 3D Pi3 (Poietis, Pessac, France) avec le module d'extrusion (Figure 28).

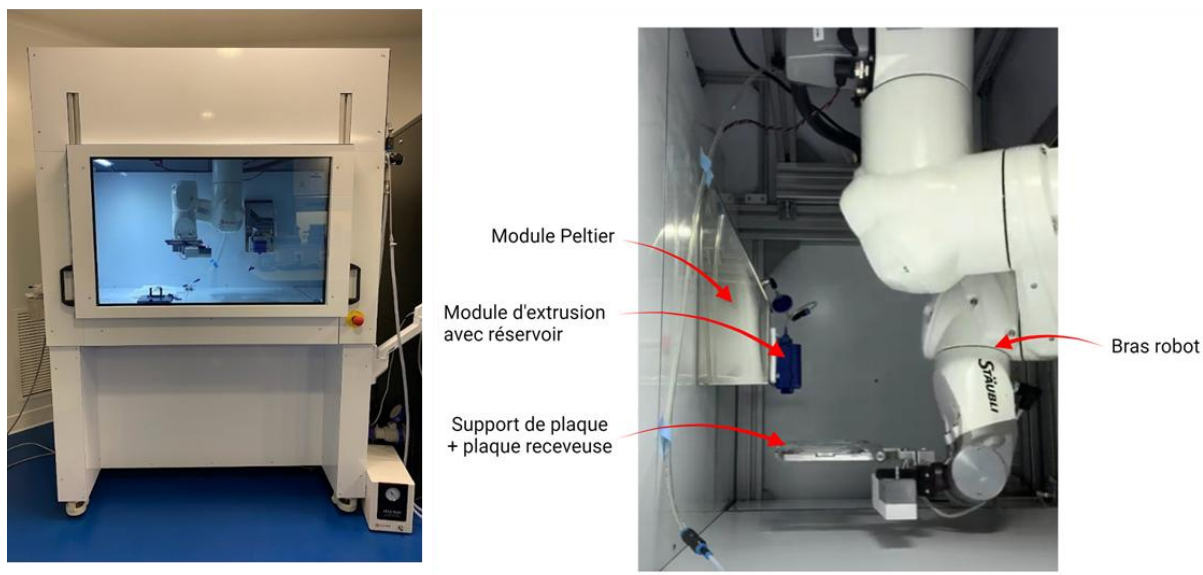


Figure 28 : Bio-imprimante 3D Pi3 (gauche) et vue de l'intérieur des différents modules (droite)

La solution de collagène fonctionnalisée ou non est transférée dans une seringue Optimum (Nordson, OH, États-Unis) maintenue à 4°C par refroidissement thermoélectrique grâce à un module Peltier. Une aiguille de 6mm de diamètre (Nordson) est fixée au réservoir pour permettre l'extrusion du collagène.

Un papier d'ancrage (papier Whatman) est préalablement découpé pour définir les emplacements des futurs patches et plaqué au fond d'une plaque à puits unique (Fisher Scientific) avec de l'éthanol 70% (Figure 29). La plaque est ensuite placée dans le support de plaque du bras robot de la bio-imprimante 3D puis la vitre de protection est refermée.

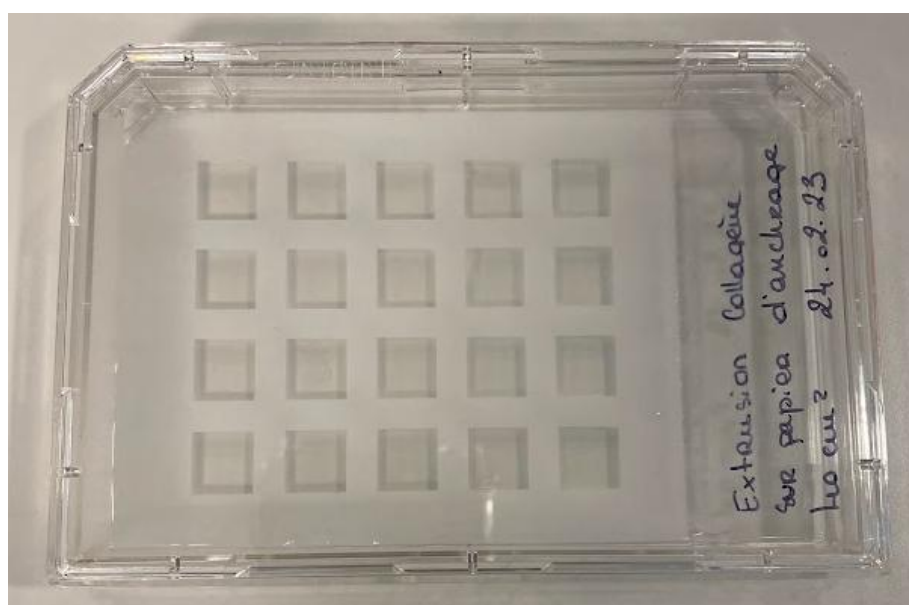


Figure 29 : Papier d'ancrage placé dans une plaque à puits unique

Les différentes séquences d'impression sont lancées via le logiciel NGB-R (Next Generation Bioprinter - Recherche) (Poietis). L'impression des patches cardiaques se fait en 3 couches de 40cm^2 :

1. Première couche : $550\mu\text{m}$ d'épaisseur
2. Deuxième couche : $700\mu\text{m}$ d'épaisseur
3. Troisième couche : $700\mu\text{m}$ d'épaisseur

Pour chaque phase d'impression, la pression d'extrusion est fixée à 2,65 bars. Entre chaque couche, le collagène est gélifié à 37°C pendant 10 minutes et le réservoir est à nouveau rempli avec une solution de collagène fonctionnalisé. Après la dernière couche, le collagène est placé à 37°C pendant 30 minutes. L'homogénéité de la répartition des cellules imprimées est vérifiée par microscope (Figure 30).

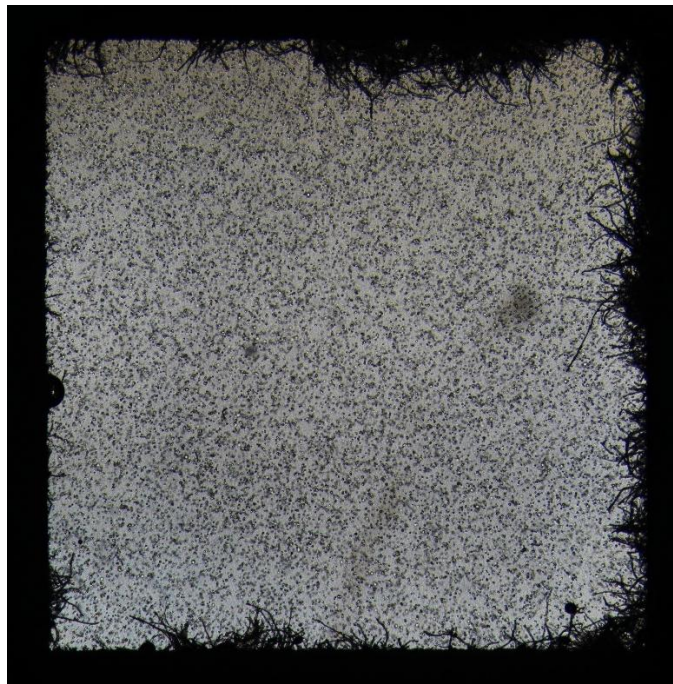


Figure 30 : Photo prise au microscope d'un patch bio-imprimé fonctionnalisé avec les mdMSC

L'épaisseur de chaque patch est mesurée par un capteur CHrocodile C (Precitec, Gaggenau, Allemagne). Les patches fonctionnalisés avec des cellules sont ensuite placés sur un gel d'agarose composé de 2/3 de milieu MesenCult™ Proliferation Kit (StemCell) et 1/3 d'agarose 2X. Les patches non fonctionnalisés sont placés sur un gel d'agarose sans milieu de culture.

2.3. Caractérisation rhéologique du patch cardiaque

Toute la caractérisation rhéologique des patches a été réalisée à la plateforme rhéologie de l'équipe ChemBioPharm INSERM U1212 de l'Université de Bordeaux avec le Dr. Alexandra Gaubert.

Les mesures sont effectuées avec un rhéomètre Kinexus Prime lab+ (Netzsch, Selb, Allemagne) avec des géométries plan/plan et le logiciel rSpace (Netzsch).

Premièrement, des échantillons avec et sans cellules sont analysés par test d'oscillation en amplitude à 37°C afin de déterminer la région viscoélastique linéaire (LVR) où G' (module de stockage) et G'' (module de perte) sont indépendants de la contrainte. La contrainte oscillatoire est augmentée de 0,01% à 99,993%. Une fois la LVR définie, la valeur de stress appliquée aux échantillons est fixée à 0,5% et la fréquence d'oscillation des géométries est augmentée de 0,1585Hz à 3,981Hz pour étudier le comportement viscoélastique du biomatériau grâce aux modules G' et G'' .

2.4. Caractérisation des CSM incorporées dans le patch cardiaque

2.4.1. Mesure de la viabilité après extrusion

Après extrusion, les patches fonctionnalisés avec les mdMSC sont placés sur le gel d'agarose contenant du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell) et sont laissés à TA. Après 72h, les patches sont placés dans un tube contenant de la collagénase 0,5% (Coger, Paris, France) avec agitation 400 rpm à 37°C pendant 30 minutes. L'action de la collagénase est ensuite inhibée avec du milieu de culture et la suspension cellulaire obtenue est filtrée avec un tamis cellulaire de 40µm.

La viabilité cellulaire est mesurée par cytométrie en flux avec un anticorps Calcein-AM (ThermoFisher) et Ethidium homodimère (ThermoFisher) marquant respectivement la viabilité et la mort cellulaire. Des iMSC fraîchement décongelées sont utilisées en contrôle positif et des iMSC incubées dans une solution de Montanox 10% (Seppic, Paris, France) pendant 30 minutes avant le marquage sont utilisées comme contrôle négatif.

Les acquisitions ont été réalisées sur le cytomètre LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences) et les résultats analysés sur le logiciel FlowJo v10.10.0 (BD Biosciences).

2.4.2. Test de cicatrisation post extrusion

Après extrusion, les patchs fonctionnalisés avec les mdMSC sont placés sur le gel d'agarose contenant du milieu de culture MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell) et sont laissés à TA. Après 24h, les patchs sont placés dans un tube contenant de la collagénase 0,5% (Coger) avec agitation 400 rpm à 37°C pendant 30 minutes. L'action de la collagénase est ensuite inhibée avec du milieu de culture et la suspension cellulaire obtenue est filtrée avec un tamis cellulaire de 40µm.

Le test de cicatrisation est réalisé selon le même protocole que celui décrit dans la section 1.5.1. Les mdMSC sontensemencées dans les transwells à $7,5 \times 10^4$ cellules/puits.

2.5. Stabilité du patch cardiaque

L'épaisseur et le poids des patchs bio-imprimés a été évaluée toutes les 24h pendant 4 jours après extrusion. Les patchs ont été placés sur un gel d'agarose contenant 50% de PBS 1X et 50% d'agarose 2X puis laissés à TA entre chaque mesure d'épaisseur avec un capteur CHrocodile C (Precitec) et chaque mesure de poids avec une balance de précision.

2.6. Congélation des patchs cardiaques

Des patchs bio-imprimés ont été placés à -20°C pendant 24h. La moitié des patchs ont été décongelés puis placés sur un gel d'agarose contenant 2/3 de milieu de MesenCult™ Prolifération Kit (StemCell) et 1/3 d'agarose 2X pendant 24h. Après 24h, l'autre moitié des patchs a été décongelée. Les patchs décongelés à T+24 et les patchs décongelés à T0 ont ensuite été placés dans des tubes contenant de la collagénase 0,5% (Coger) avec agitation 400rpm à 37°C pendant 30 minutes. L'action de la collagénase est ensuite inhibée avec du milieu de culture et la suspension cellulaire obtenue est filtrée avec un tamis cellulaire de 40µm.

La viabilité cellulaire est mesurée selon le même protocole que celui décrit dans la section 2.4.1.

3. Evaluation *in vivo* des patchs cardiaques fonctionnalisés par les mdMSC

dans un modèle de dysfonction ventriculaire gauche chez le rat

3.1. Considérations éthiques et modèle animal

Toutes les procédures ont été approuvées par le Comité d’Ethique de l’Université de Paris (Projet APAFIS#25824 2020021813518056 v3) et sont conformes à la législation européenne (directive de la Commission européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques) ainsi qu’aux directives ARRIVE 2.0 sur les rapports scientifiques d’expériences *in vivo*. Des rats mâles Wistar de 7 semaines (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) sont hébergés à l’ERI (Établissement Rongeur Inserm) dans des conditions contrôlées de température ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et d’humidité (65-70%), avec une alternance des cycles lumière/obscurité de 12 h/12 h, et bénéficient d’un accès libre à l’eau et à la nourriture. A leur arrivée, les rats sont regroupés par trois dans chaque cage puis par deux lorsqu’ils dépassent les 300g. Chaque cage est aménagée avec des éléments d’enrichissement (abris, substrats pour la construction de nids, bois à ronger).

La Figure 31 illustre la chronologie du protocole expérimental.

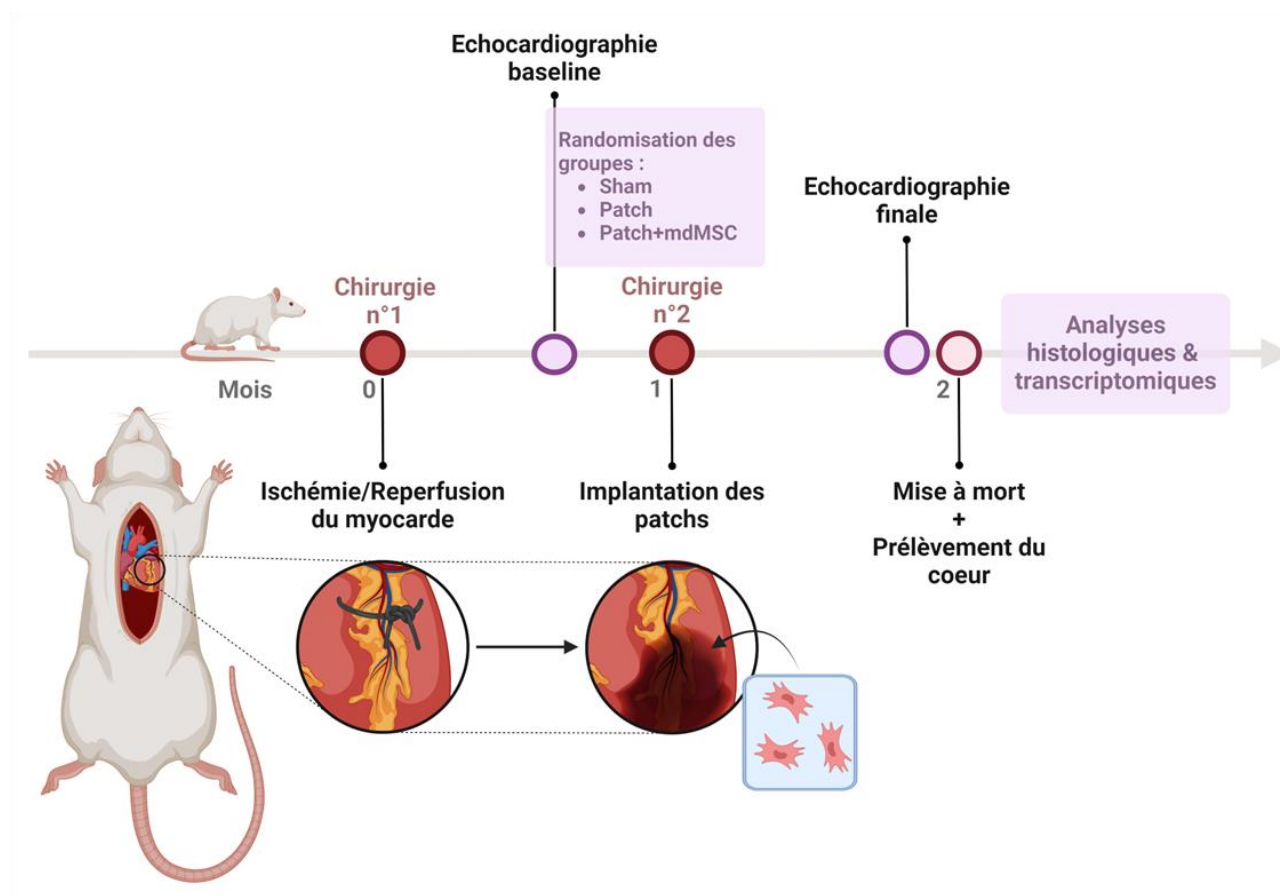


Figure 31 : Protocole expérimental pour l'évaluation *in vivo* des patches cardiaques fonctionnalisés par les mdMSC

3.2. Procédures chirurgicales

3.2.1. Induction de la dysfonction ventriculaire gauche par ischémie et reperfusion du myocarde

Une semaine après l'arrivée à l'ERI, les rats sont analgésiés par injection sous cutanée de buprénorphine (Axience, Pantin, France) à 0,05mg/kg avec une aiguille 25G puis anesthésiés dans une cage à induction avec de l'isoflurane (2,5%) et de l'oxygène (1L/min). Les animaux sont intubés avec un otoscope (Welch Allyn, Pluvigner, France) et ventilés avec un respirateur ALPHA LAB (Minerve, Esternay, France). Les rats sont placés sur le dos, sur une plaque chauffante à 37°C pour maintenir leur température corporelle, et du lubrifiant oculaire Lubrithal (Dechra Pharmaceuticals, Northwich, UK) est appliqué sur leurs yeux. La partie supérieure gauche du thorax des rats est tondue puis désinfectée avec une solution antiseptique Vétédine (Vetoquinol, Lure, France). Une anesthésie locale par lidocaïne est réalisée par injection sur le site de l'incision puis les muscles et les côtes sont ouverts par thoracotomie. Une fois le cœur exposé, l'ischémie du ventricule gauche est induite par l'occlusion temporaire de l'artère coronaire gauche à l'aide d'un fil monofilament 6/0 en PDVF (Péters Surgical, Boulogne Billancourt, France) passé dans un tube en plastique et maintenu contre la paroi myocardique au moyen d'un clamp (Figure 32) pendant 45 minutes. Pendant toute la procédure, les tissus exposés sont régulièrement maintenus hydratés à l'aide de compresses stériles imprégnées d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 %.

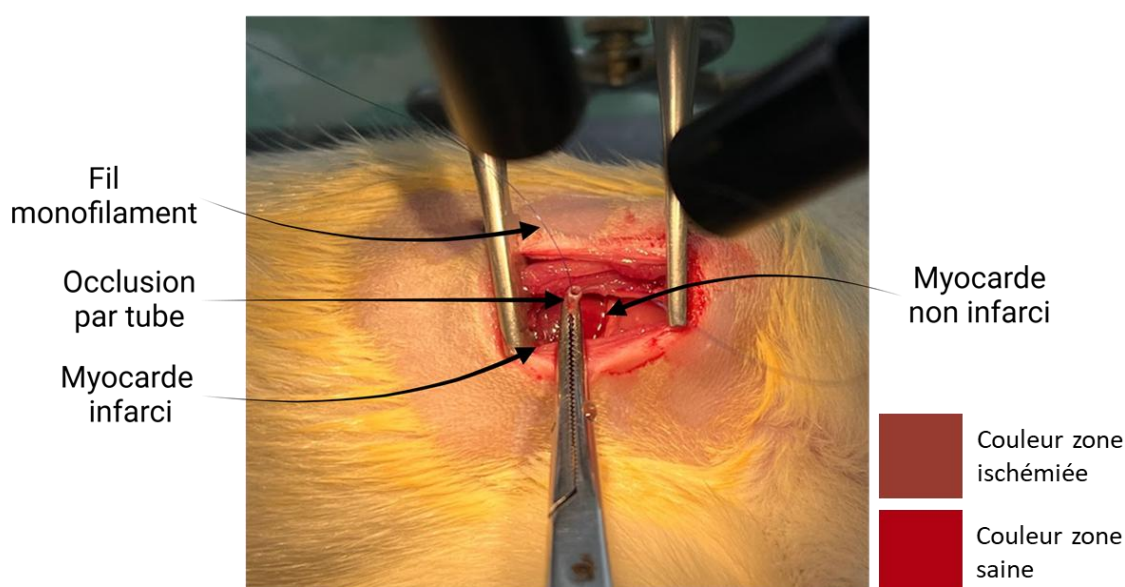


Figure 32 : Photo de la ligature temporaire de l'artère coronaire gauche

La fermeture de la thoracotomie est réalisée avec un fil de suture résorbable enduit et tressé d'acide polyglycolique (Péters Surgical) juste après la pose d'un cathéter entre les côtes adjacentes à l'ouverture afin de drainer les fluides et l'air dans la cage thoracique. L'anesthésie est arrêtée et les rats sont surveillés jusqu'à leur réveil. Après 24h, de la buprénorphine à 0,05mg/kg est injectée puis à nouveau après 48h si les signes de douleurs le nécessitent (selon un tableau de notation des points limites).

3.2.2. Implantation des patches cardiaques

Un mois après l'induction de la dysfonction ventriculaire gauche par ischémie/reperfusion, une nouvelle thoracotomie est réalisée selon le mode opératoire décrit précédemment (section 3.2.1). Le tissu adipeux et les adhérences présents sur la zone d'implantation du patch sont retirés afin de permettre une bonne adhésion. Le patch est découpé avec un scalpel en suivant la découpe du papier d'ancrage puis il est déposé sur un carré de TachoSil (Takeda France SAS, Paris, France) légèrement plus grand que le patch. La zone infarctée du cœur est séchée avec une compresse stérile puis le patch et le TachoSil sont appliqués contre le myocarde avec une compresse stérile humide pendant trois minutes.

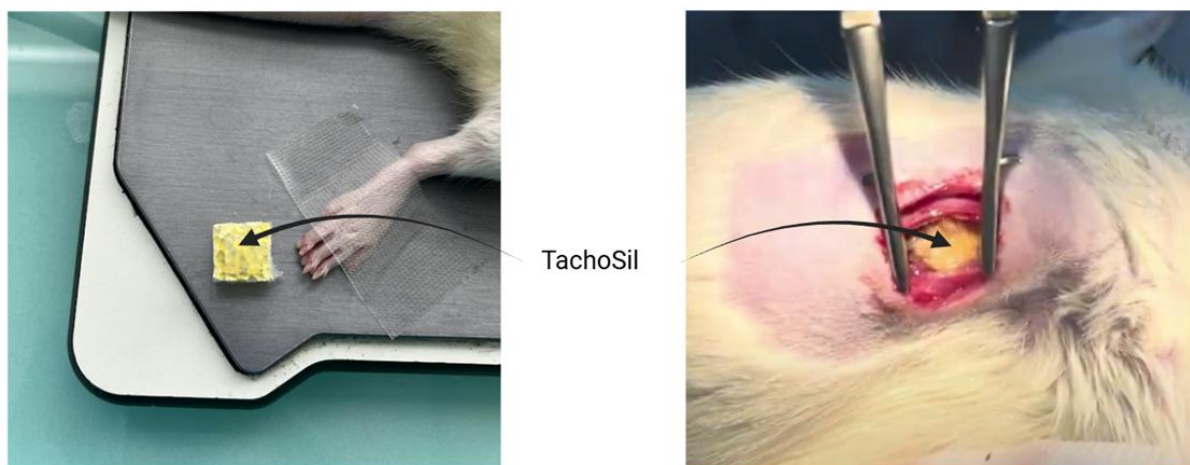


Figure 33 : Photo du TachoSil avant (gauche) et après implantation sur le myocarde (droite) pour maintenir le patch sur la zone infarctée.

Selon les différents groupes expérimentaux, les rats reçoivent les traitements suivants :

- Sham : aucun traitement
- Patch : patch de collagène sans cellules
- Patch + cellules : patch de collagène fonctionnalisé avec les mdMSC

La fermeture de la thoracotomie est réalisée selon le mode opératoire décrit précédemment.

3.2.3. Mise à mort et prélèvement

La mise à mort a lieu un mois après implantation du traitement. Les animaux sont profondément anesthésiés avec de l'isoflurane (5%) et la cage thoracique est ouverte par sternotomie. Le cœur est prélevé et immédiatement rincé dans du PBS 1X. La base et l'apex sont séparés pour avoir une coupe transversale du cœur. Les deux parties sont congelées dans du gel Optimal Cutting Temperature (OCT) (Cell Path, Newtown, UK) avec de l'azote liquide puis stockées à -80°C.

3.3. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie

Une échocardiographie baseline est réalisée trois semaines après l'infarctus avec le Visualsonics 2100 ultrasound system (Fujifilm, Toronto, Canada) équipé d'une sonde de 13–24 MHz. Les rats sont anesthésiés par isoflurane (2,5%) et placés sur une plaque chauffante. La température corporelle ainsi que les battements cardiaques et la fréquence respiratoire sont monitorées pendant toute la procédure. Des images en parasternale grand axe Mode B (Brightness mode) et Mode M (Motion mode) sont enregistrées puis analysées par la plateforme d'imagerie du vivant (PIV) de Cochin pour mesurer les volumes télésystoliques (VTS), les volumes télédiastoliques (VTD), fraction d'éjection ventriculaires gauches (FEVG) et le volume d'éjection systolique (VES). La FEVG et la VES sont calculées selon les équations ci-dessous :

$$FEVG = \frac{VTD - VTS}{VTS} \times 100$$

$$VES = VTD - VTS$$

La même procédure est réalisée un mois après l'implantation du traitement. Toutes les analyses sont réalisées à l'aveugle.

L'indice d de Cohen pour une variance inégale a été calculé selon l'équation suivante :

$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma_{pooled}}$$

Où :

$\bar{x}_1$: moyenne du groupe 1 et $\bar{x}_2$: moyenne du groupe 2

σ_{pooled} : Ecart-type groupé des 2 groupes, calculée selon l'équation suivante :

$$\sigma_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times \sigma_1^2 + (n_2 - 1) \times \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Où :

n_1 : effectif du groupe 1 et n_2 : effectif du groupe 2

σ_1 : l'écart-type du groupe 1 et σ_2 : l'écart-type du groupe 2

3.4. Analyses histologiques

Les cœurs cryopreservés sont sectionnés en coupes de 7µm avec un cryostat CryoStar NX70 (Epredia, Portsmouth, NH, États-Unis). Sur six niveaux différents de la base et de l'apex, dix coupes sont réalisées afin d'obtenir un panel représentatif de toutes les parties du cœur. Les images des colorations visibles en lumière blanche sont acquises à l'aide du scanner de lames haut débit SLIDEVIEW™ VS200 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japon). La quantification de la taille de l'infarctus est réalisée sur le logiciel ImageJ et l'analyse du collagène interstitiel, par le logiciel FIBER_ML, dans tous les cas, à l'aveugle.

3.4.1. Taille de l'infarctus

Les coupes congelées sont fixées dans une solution de formaldéhyde à 3,7 % pendant 10 minutes, puis rincées deux fois à l'eau courante pendant 5 minutes. Elles sont ensuite colorées avec de l'hématoxyline pendant 10 minutes, lavées deux fois dans de l'eau courante pendant 3 minutes, puis immergées dans un bain de Fuchsine-Ponceau pendant 5 minutes. Les lames sont à nouveau rincées dans deux bains d'eau distillée pendant 3 minutes avant d'être colorées dans l'acide phosphomolybdique 1% pendant 7 minutes puis dans le vert lumière pendant 5 minutes et dans l'acide acétique pendant 30 secondes. Les coupes sont ensuite déshydratées dans une solution d'éthanol 80% avec 1% d'acide acétique puis dans solution d'éthanol 100% avec 1% d'acide acétique suivis de trois bains successifs de xylène durant 3 minutes. Les lames sont montées avec du milieu de montage Pertex.

3.4.2. Collagène interstitiel

Les coupes congelées sont placées dans un bain d'éthanol 80% pendant 2 minutes puis réhydratées dans deux bains d'eau courante pendant 3 minutes. Elles sont ensuite colorées dans un bain de rouge Sirius 0,1% (0,1g/100 mL dans l'acide picrique) pendant 16 minutes et rincées 30 secondes dans un bain d'eau courante. Les coupes sont ensuite déshydratées dans un bain d'éthanol 95% de 30 secondes puis deux bain d'éthanol 100% pendant 3 minutes chacun suivis de trois bains successifs de xylène durant 3 minutes. Les lames sont montées avec du milieu de montage Pertex.

3.4.3. Angiogenèse

Les capillaires sont marqués pour quantifier l'angiogenèse. Les coupes congelées sont fixées à l'acétone pendant 10 minutes puis réhydratées dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite placées dans une chambre humide et les peroxydases endogènes, l'avidine et la biotine et les sites de liaisons non spécifiques sont bloquées pendant 10 minutes respectivement avec une solution Peroxidized 1 (Biocare medical Pacheco, CA, USA), un kit Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) pendant 10 minutes et du sérum normal de cheval (Vector) pendant 20 minutes. Les lames sont rincées dans du PBS pendant 3 minutes entre chaque blocage. Les coupes sont incubées avec un anticorps RECA-1 (Bio-Rad) dilué au 1/30^{ème} puis avec un anticorps cheval anti-souris biotinylé (Vector) dilué au 1/200^{ème} et un kit ABC Kit Peroxidase (Vector) pendant 30 minutes chacun. Les lames sont rincées dans du PBS 1X pendant 5 minutes entre chaque incubation. Le marquage est révélé avec une incubation d'une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Vector) pendant 6 minutes puis les lames sont rincées 5 minutes dans du PBS 1X et contre-colorées à l'hématoxyline (Eurobio) pendant 5 minutes. Les coupes sont déshydratées dans trois bains d'éthanol 70%, 80% et 100% suivis de trois bains successifs de xylène pendant 1 minute. Les lames sont montées avec du milieu de montage Pertex.

3.5. Analyses transcriptomiques

Les ARN totaux sont extraits des coupes de tissus cardiaques avec du TRIzol™ (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. La concentration et la pureté de l'ARN obtenu sont quantifiés

par spectrophotométrie avec le NanoDrop™ One (ThermoFisher) puis l'ARN est rétrotranscrit en ADNc avec le kit QuantiTect Rev. Transcription (Qiagen).

L'expression des gènes impliqués dans la fibrose, l'apoptose et l'insuffisance cardiaque est évaluée selon le même protocole que celui décrit dans la section 1.5.3.

Les séquences et les températures d'hybridation (annealing temperature) des amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 5. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle négatif (Sham).

Espèce	Gène	Sens	Séquence (5' vers 3')	Température d'hybridation	Rôle
Rat	<i>Col1a1</i>	Forward	AGCATGTCTGGTTTGGAGAG	60°C	Fibrose
		Reverse	GTGATAGGTGATGTTCTGGGAG		
	<i>Col3a1</i>	Forward	GTGAACATGGCCCTCCAG	60°C	Fibrose
		Reverse	CCTCTTTCTCCTTTAGCACCTG		
	<i>Cxcl9</i>	Forward	CAAACCTGCCTAGACCCAGATTCA	59,6°C	Inflammation
		Reverse	GACTCCGGATGGTGGGGTGTTTA		
	<i>Cxcl11</i>	Forward	ACGGTTCAGGCTTCGTTATGTTT	59,6°C	Inflammation
		Reverse	GGTCCAGGCACCTTGTCTTTAT		
	<i>Ddah1</i>	Forward	GCTGGCCCCAACCTGATCGCAATA	62,2°C	Fonction cardiaque
		Reverse	CGTCCGGTACAGTGAGCTTGTCAT		
	<i>Errfi1</i>	Forward	GCCGTTTCTGGACCATGTTATCTA	60,1°C	Apoptose
		Reverse	CACCCACGATAACTCTCAATCAT		
	<i>Fn1</i>	Forward	GGTACCACTGGCCACCTACAAC	59,6°C	Fibrose
		Reverse	GCACGTCCAACGGCATGAAGCATT		
	<i>Gapdh</i>	Forward	GGGCTCTGCTCTCCCTGTTCT	63,7°C	Gène de ménage
		Reverse	TCACAAGAGAAGGCAGCCCTGGTA		
	<i>Ly6c</i>	Forward	TGTGCAGAAAGAGCTCAGGGCTTA	60°C	Inflammation
		Reverse	ACAGAGCCCTCTACAGCTTCTAAC		
	<i>Nppb</i>	Forward	CGGGCTGAGGTTGTTTAGGAAGA	59,2°C	Insuffisance cardiaque
		Reverse	GGCAAGTTTGCTGGAAGATAAG		
	<i>Plod2</i>	Forward	TCCGGCCTCACCACGATGCGTCAA	62,5°C	Fibrose
		Reverse	CGGGGGGATTTCGATGGAGCAATTA		
	<i>Postn</i>	Forward	ATAGACGGGGTTCCTGTTGAAATA	59,2°C	Remodelage cardiaque
		Reverse	TGATCGCCTTCTAGACCCCTGAAC		
	<i>Ptgs2</i>	Forward	TCTGGTGCCGGGTCTGATGATGTA	62,5°C	Inflammation
		Reverse	CGCTCAGGTGTTGCACGTAGTCTT		
	<i>Thbs1</i>	Forward	TACCAGTCCAGCAGCCGCTTCTAC	62,8°C	Remodelage cardiaque
		Reverse	CGGGGCCAGTGGTGGAGTTACAA		

Tableau 5 : Liste des amorces rats pour les qPCR

3.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données *in vitro* ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Pour les comparaisons multiples, les résultats présentant une distribution normale ont été analysés par une analyse de variance univariée (one-way ANOVA) avec une correction par le test multiple de Dunnett ou de Tukey, tandis que les données non paramétriques ont été évaluées par un test de Kruskal-Wallis avec une

correction par le test multiple de Dunnett. Les résultats sont exprimés en moyenne ($\pm$ écart type) pour les données normalement distribuées.

Les analyses statistiques des données *in vivo* ont été réalisées à l'aide du même logiciel. Pour comparer les valeurs fonctionnelles cardiaques entre les groupes expérimentaux, des tests ANOVA à deux facteurs (2-way ANOVA) ont été utilisés. L'évolution des fonctions cardiaques entre les groupes a été évaluée par une analyse one-way ANOVA ou, en cas de données non paramétriques, par des tests de Kruskal-Wallis, suivis de comparaisons multiples appariées avec correction de Dunnett.

Résultats

4. Production des VE et des CSM

4.1. Caractérisation des CSM

Les CSM ont été caractérisées selon les critères définis par l'ISCT : 1) adhérence au plastique en culture standard, (2) expression des marqueurs CD105, CD73 et CD90, et absence des marqueurs CD45, CD31, CD14 (3) capacité de différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro* (163).

4.1.1. CSM dérivées d'iPSC (iMSC)

Les iMSC sont caractérisées par cytométrie en flux avant leur utilisation dans des tests *in vitro* ou *in vivo*.

Après décongélation à passage 0, les iMSC présentent les principaux marqueurs des CSM (CD90, CD105, CD73) et n'expriment pas de marqueurs hématopoïétiques (CD14, CD31, CD45) (Figure 34).

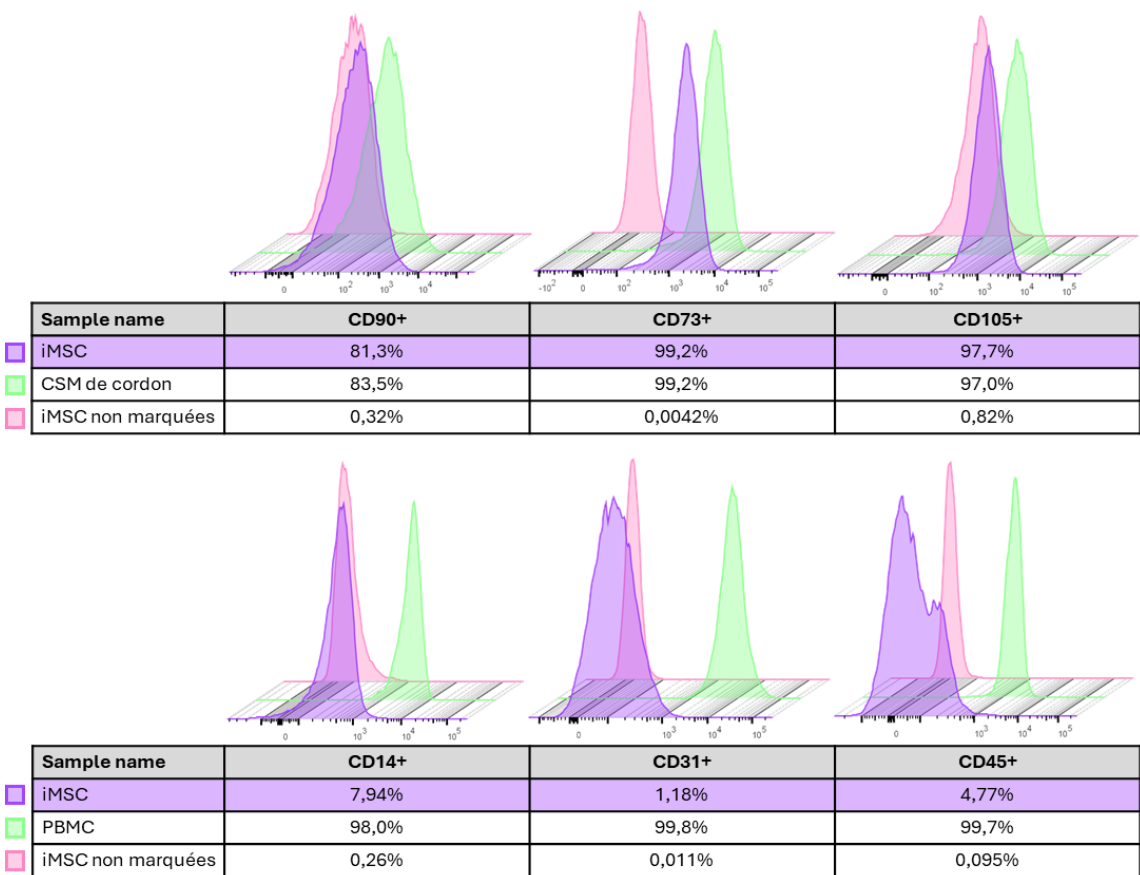


Figure 34 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface des iMSC à P0 (en violet : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif)

Cependant, après expansion et constitution d'une banque au passage 3, une modification de l'expression des marqueurs de surface des CSM a été observée. En effet, seule 31 % de la population d'iMSC continue d'exprimer CD90, et l'expression de CD105 est complètement perdue. En revanche, l'expression de CD73 ainsi que celle des marqueurs hématopoïétiques (CD14, CD31, CD45) reste inchangée en comparaison avec le passage précoce (Figure 35).



Figure 35 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface des iMSC à P3 (en violet : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif)

Dans la mesure où ces CSM proviennent de cellules iPS, nous avons émis l’hypothèse qu’une population de CSM différenciées pourrait émerger au cours des passages, expliquant les modifications observées dans l’expression des marqueurs de surface. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression de facteurs de transcription associés à la pluripotence aux passages 0 et 5. À la décongélation (passage 0), 93,2 % des iMSC exprimaient Nanog, tandis que Sox2 et Oct3/4 étaient absents. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Pierantozzi et al., qui ont montré que seul Nanog est exprimé dans les CSM

humaines en culture, principalement dans les cellules en prolifération, son expression diminuant aux passages avancés (164).

Au passage 5, l'expression de Nanog est détectée dans 67 % des cellules, tandis que Sox2 et Oct3/4 apparaissaient progressivement, exprimés respectivement dans 22,5 % et 13,1 % des iMSC (Figure 36). Ces données suggèrent une activation progressive de ces facteurs de transcription au fil des passages, indiquant une possible acquisition partielle d'un état de pluripotence par une sous-population d'iMSC.

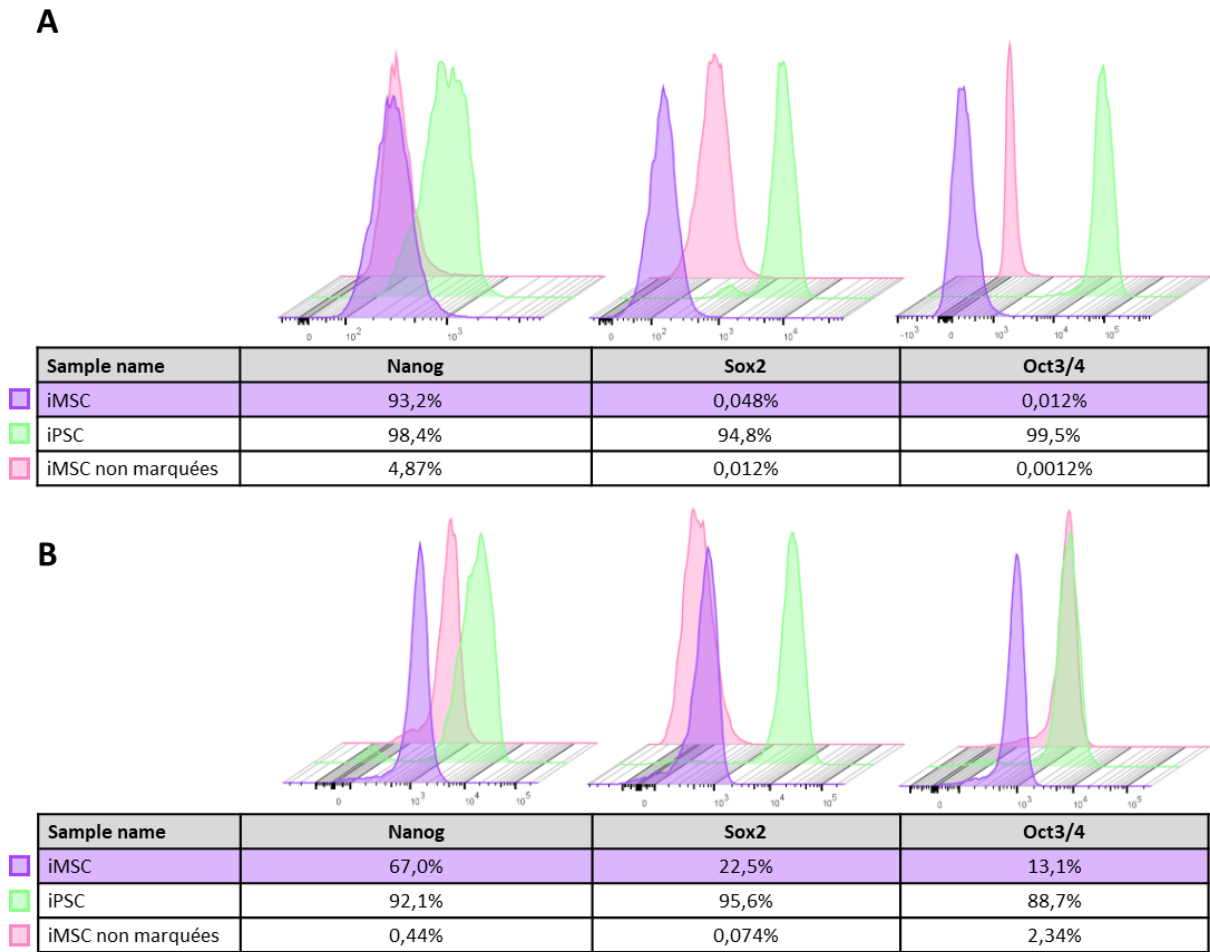


Figure 36 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des facteurs de transcription Nanog, Sox2 et Oct3/4 des iMSC (en violet : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif).
(A) iMSC à passage 0. (B) iMSC à passage 5

Les iMSC ont aussi été caractérisées par leur capacité à se différencier dans les trois types cellulaires caractéristiques des CSM : les adipocytes, les ostéocytes et les chondrocytes.

Ainsi, la différenciation des iMSC en adipocytes est évaluée par la formation de gouttelettes

lipidiques colorées par du rouge huile O. La différenciation en chondrocytes se traduit par la formation de sphéroïdes cartilagineux exprimant des glycosaminoglycanes, visualisés avec du bleu alcian. Enfin, la capacité des iMSC à se différencier en ostéocytes est confirmée par la sécrétion de calcium, détectée par le marquage au rouge alizarine (Figure 37).

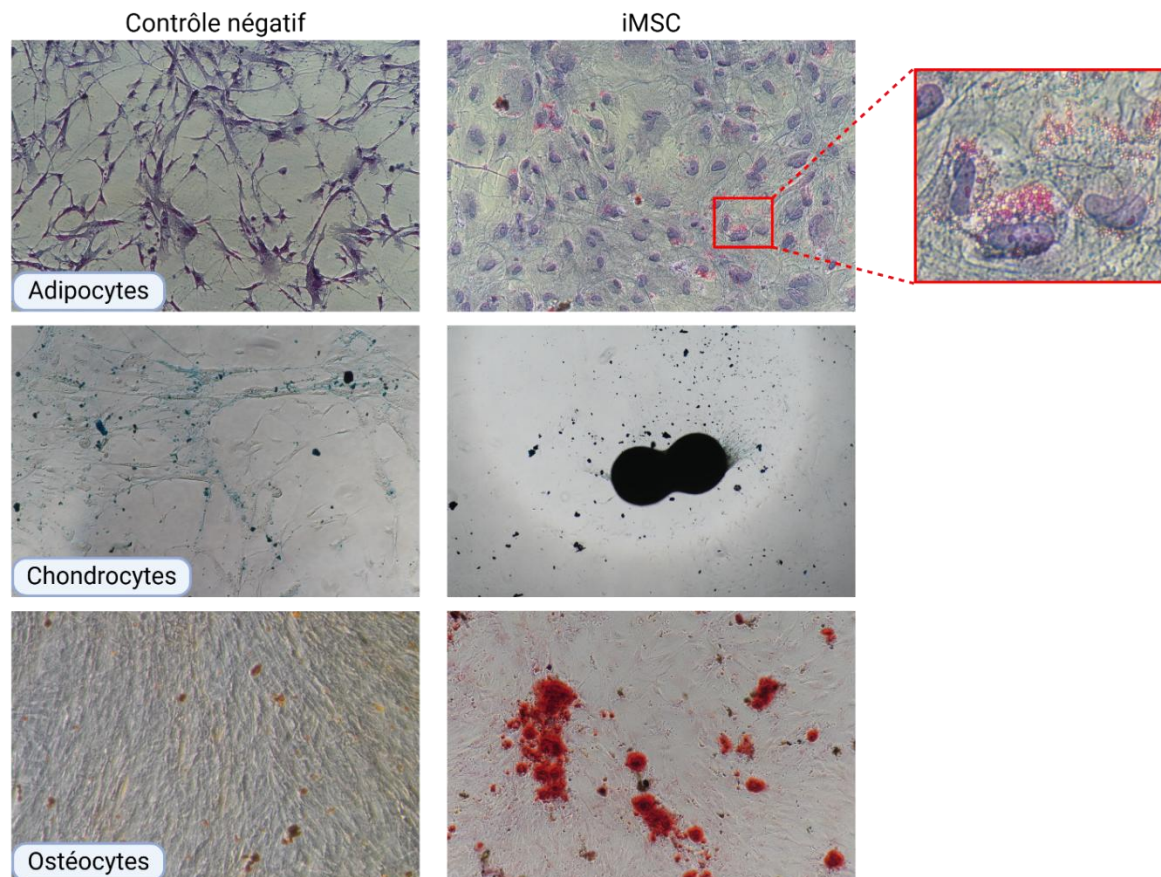


Figure 37 : Photos des iMSC non différenciées et après différenciation en trois types cellulaires : adipocytes, chondrocytes et ostéocytes

L'immunogénicité des iMSC a été évaluée avec un test MLR (Figure 38). Quel que soit le rapport iMSC:PBMC, il n'y a pas d'augmentation de la prolifération des lymphocytes T. Les iMSC ne sont donc pas immunogènes. De plus, une diminution importante de cette prolifération pour les rapports les plus élevés (1:1 à 1:10) est observée, ce qui indique un potentiel immunomodulateur. En revanche, l'activation des iMSC avec l'IFN γ n'influence pas la prolifération des lymphocytes T.

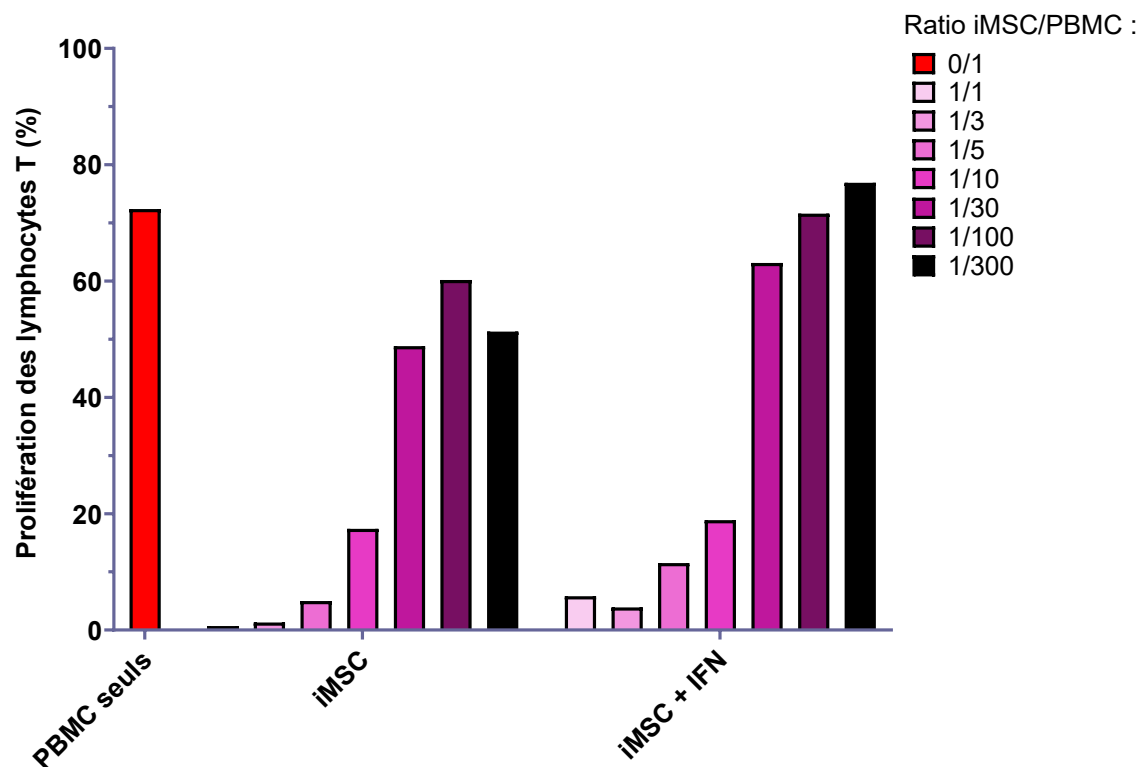


Figure 38 : Pourcentage de prolifération de lymphocytes T (CD3+) en présence de iMSC avec ou sans activation à l'IFN γ avec différents rapports (n=1).

4.1.2. CSM dérivées de muscle squelettique (mdMSC)

Les mdMSC sont caractérisées par cytométrie en flux avant leur utilisation dans des tests *in vitro* ou *in vivo*.

Après décongélation à passage tardif (passage 5), les mdMSC présentent les marqueurs des CSM (CD90, CD105, CD73) et n'expriment pas de marqueurs hématopoïétiques (CD14, CD31, CD45, HLA-DR) (Figure 39).

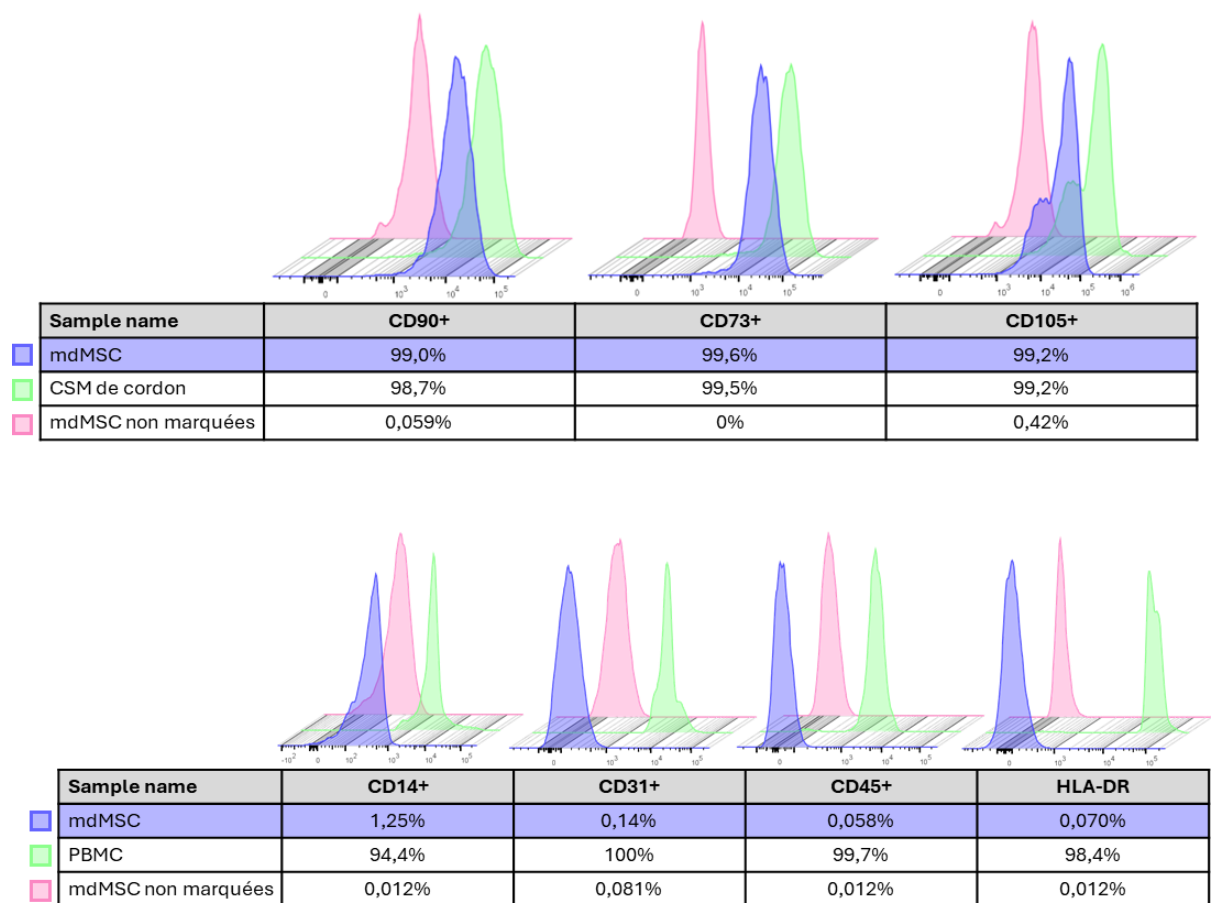


Figure 39 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface des mdMSC à P5 (en bleu : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif, en rose: le contrôle négatif)

La capacité de différenciation des mdMSC est analysée selon la même méthodologie que celle utilisée précédemment (Figure 40).

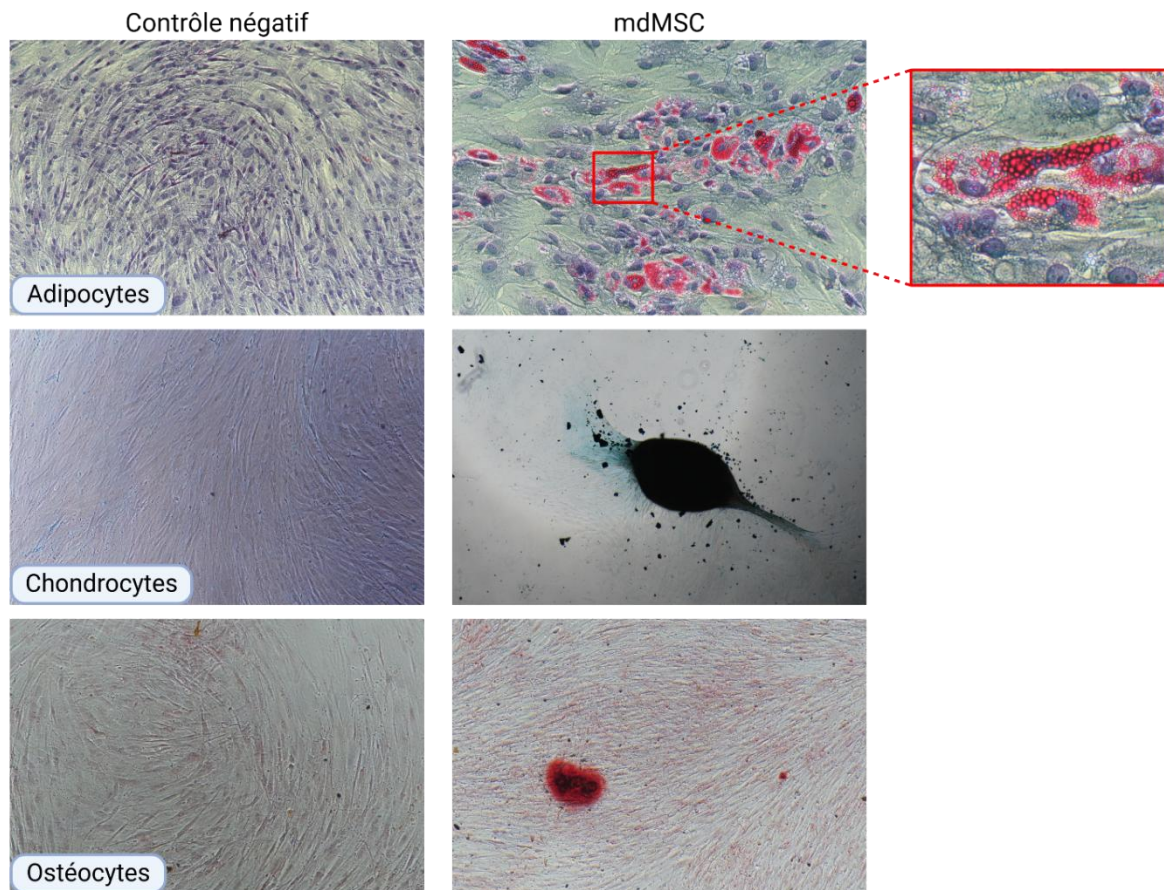


Figure 40 : Photos des mdMSC non différenciées et après différenciation en trois types cellulaires : adipocytes, chondrocytes et ostéocytes

L'immunogénicité des mdMSC a été évaluée avec un test MLR (Figure 41). Quel que soit le rapport mdMSC:PBMC, il n'y a pas d'augmentation de la prolifération des lymphocytes T. Les mdMSC ne sont donc pas immunogènes. De plus, une diminution importante de la prolifération est observée pour les rapports les plus faibles (1:1 à 1:10), ce qui traduit un potentiel immunomodulateur. Contrairement aux iMSC, l'activation avec l'IFN γ semble renforcer la capacité de ces cellules à diminuer la prolifération des lymphocytes T notamment pour les rapports les plus élevés (1:1 à 1:30).

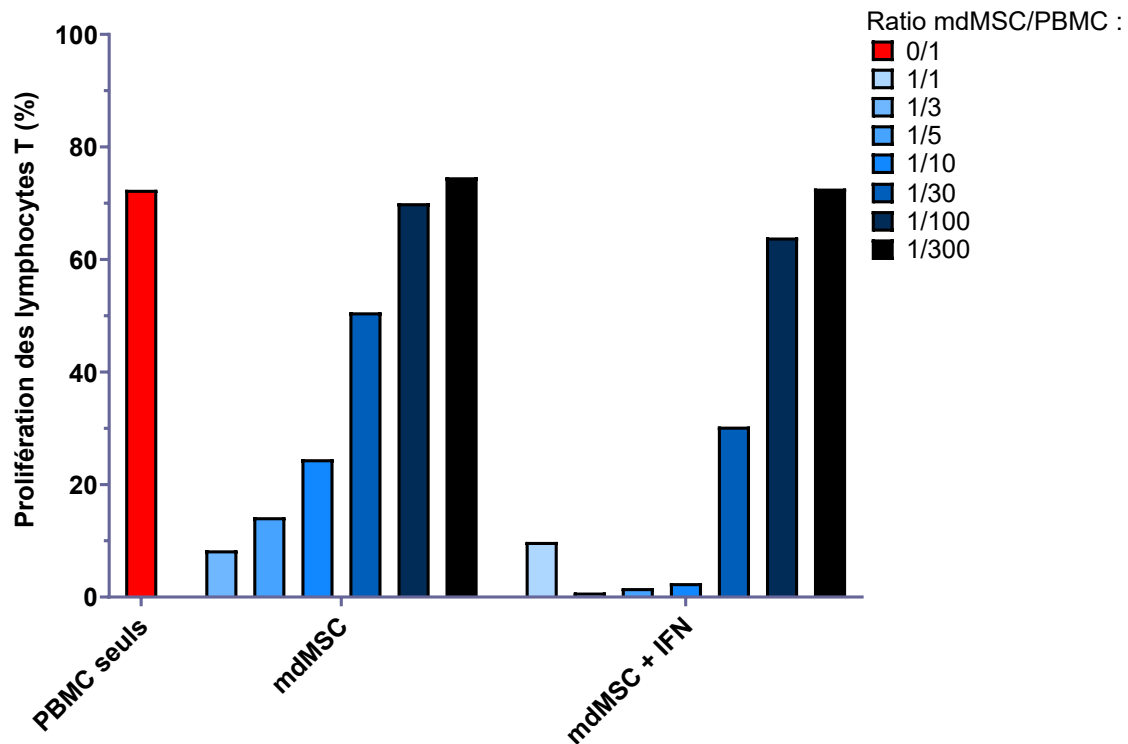


Figure 41 : Pourcentage de prolifération de lymphocytes T (CD3+) en présence de mdMSC avec ou sans activation à l'IFN γ avec différents rapports (n=1).

4.2. Caractérisation des VE

Après la production et leur isolation à partir des iMSC et des mdMSC, les VE sont caractérisées selon les MISEV (60) par cytométrie en flux pour évaluer l'expression de leurs marqueurs de surface ainsi que par NTA pour mesurer leur taille et leur nombre.

4.2.1. Marqueurs de surface

L'analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux avec le kit MACSplex montre l'expression des tétraspanines spécifiques des VE (CD9, CD63, CD81) ainsi que des marqueurs retrouvés à la surface des cellules mères (CD29, CD44, CD105, CD146). Les marqueurs associés aux cellules hématopoïétiques (CD31, CD45, HLA-DR, DP, QD) qui sont absents chez les CSM mères le sont aussi chez les VE filles (Figure 42). Bien que les niveaux d'expression des tétraspanines soient comparables entre les VE dérivées des iMSC et celles issues des mdMSC, les VE provenant des mdMSC présentent une expression plus importante des marqueurs caractéristiques des CSM.

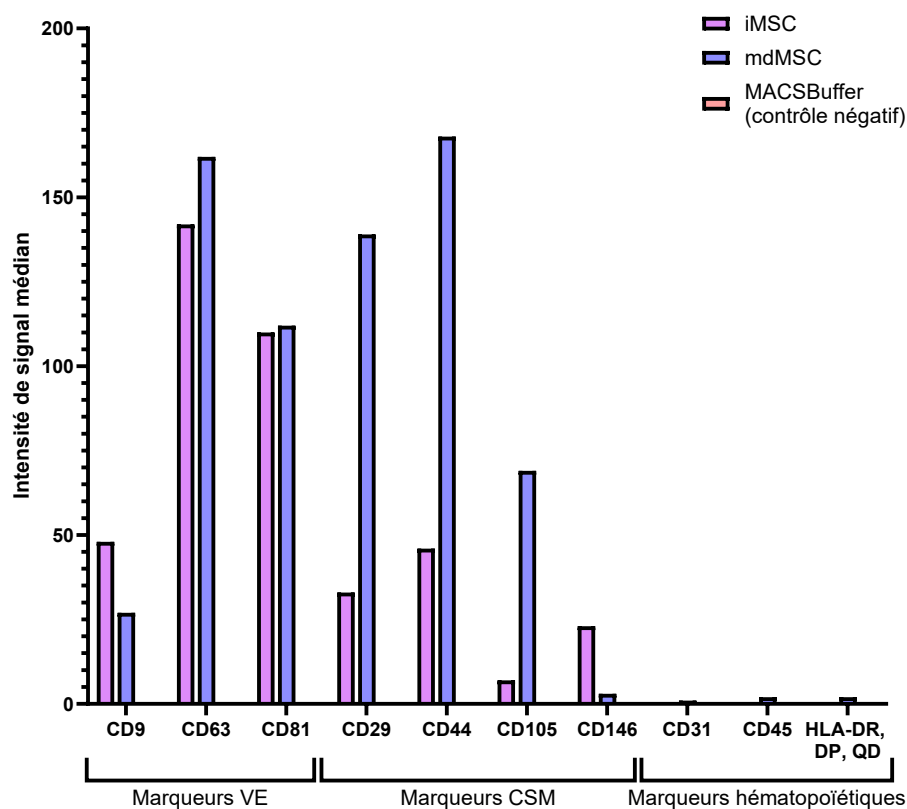


Figure 42 : Marqueurs de surface des VE de CSM analysés par cytométrie en flux

4.2.2. Taille et quantification des VE

L'analyse par NTA permet de caractériser les VE en fonction de leur concentration et de leur distribution en taille grâce aux mouvements browniens des particules en suspension. Les milieux conditionnés issus des mdMSC présentent une concentration de VE légèrement supérieure ainsi qu'une distribution en taille plus homogène par rapport à ceux obtenus à partir des iMSC. La taille moyenne des VE (≈ 150 nm) reste comparable dans les deux conditions, avec une plage de distribution allant de 50 à 400 nm (Figure 43).

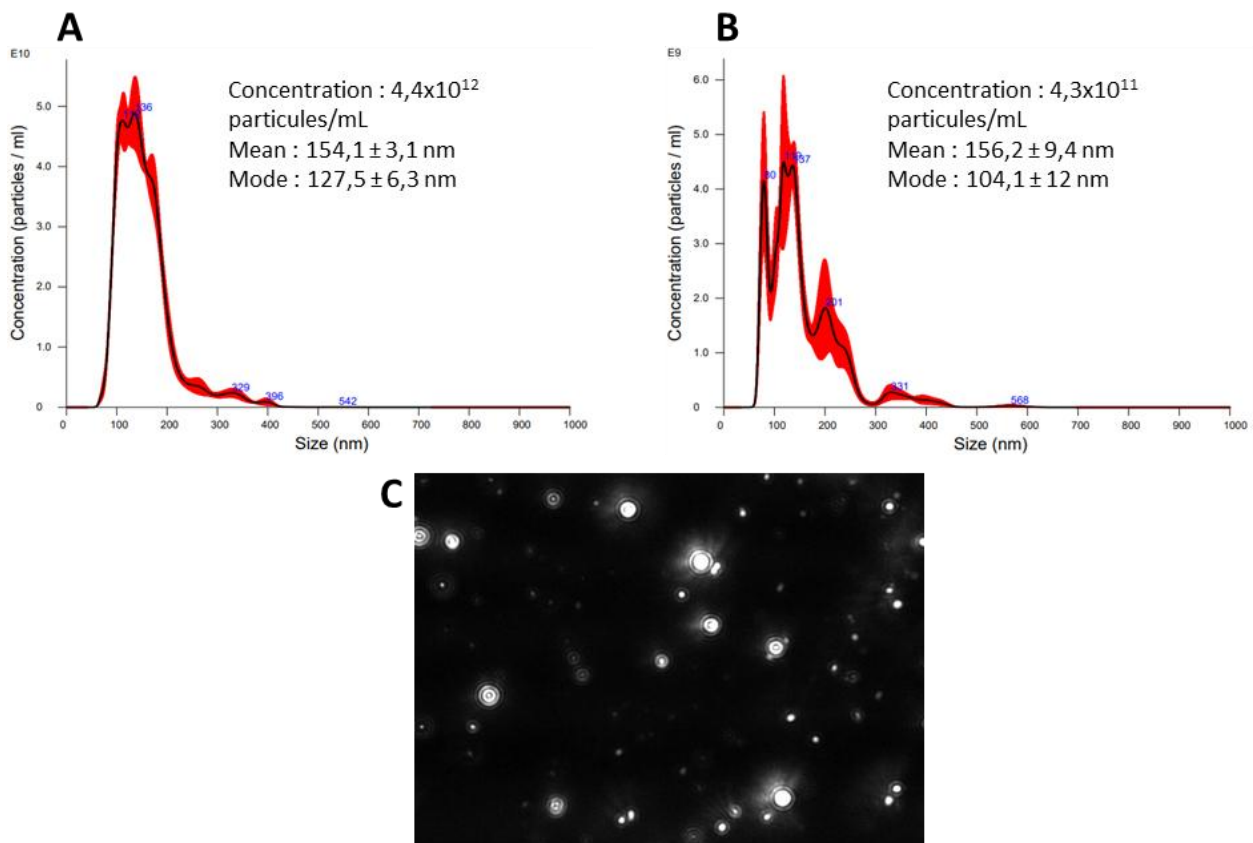


Figure 43 : Analyse par NTA de la distribution des VE en fonction de leur concentration et de leur taille. (A) VE dérivées de mdMSC. (B) VE dérivées de iMSC. (C) Image des VE obtenues lors de l'analyse au NTA.

4.3. Tests d'évaluation du potentiel thérapeutique *in vitro*

4.3.1. Test de cicatrisation

Le test de cicatrisation (ou scratch test) a été utilisé pour évaluer le potentiel pro-angiogénique des différents agents thérapeutiques. Dans la condition de milieu complet (contrôle positif), la cicatrice est entièrement recolonisée après 24 h, tandis que dans la condition de milieu pauvre (contrôle négatif), la fermeture de la cicatrice est minimale, voire absente. L'ajout des deux types cellulaires, mdMSC et iMSC, entraîne une amélioration dose-dépendante de la cicatrisation, plus importante avec les mdMSC et significative pour les deux doses de mdMSC ainsi que pour la dose la plus élevée d'iMSC par rapport au contrôle négatif (milieu pauvre). Par ailleurs, les VE dérivées d'iMSC semblent induire une amélioration légèrement supérieure de la cicatrisation comparativement aux VE dérivées de mdMSC, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (Figure 44). Les mdMSC présentent ainsi un potentiel pro-angiogénique supérieur à celui de leurs VE, tandis que les iMSC et leurs VE exercent un effet

semblable.

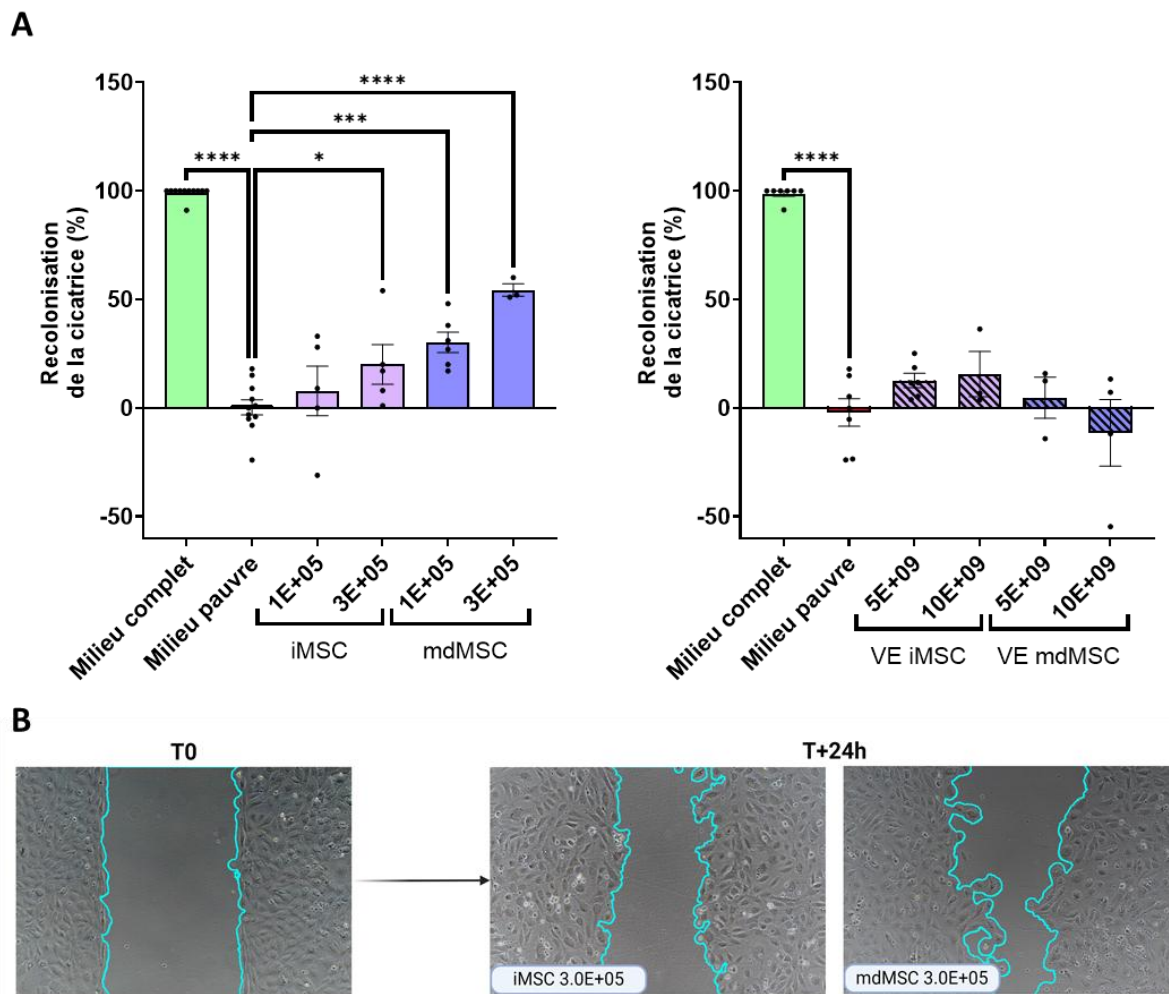


Figure 44 : Evaluation du potentiel pro-angiogénique des CSM (gauche) et des VE (droite) par test de cicatrisation (A) p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,001$ (**), $\leq 0,0001$ (****) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Dunnett. (B) Photos des HUVEC à T0 et à T+24h après incubation des iMSC et des mdMSC

4.3.2. Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité permet de déterminer le potentiel anti-apoptotique des différents agents thérapeutiques. La viabilité cellulaire est mesurée après un stress d'une heure avec de la staurosporine dans du milieu pauvre (MP). Tous les résultats ont été normalisés sur la condition négative MP. Une légère amélioration, non significative, de la viabilité cellulaire est observée lors de la co-culture des iMSC avec les HUVEC, indépendamment de la dose utilisée. En revanche, l'ajout de mdMSC ou de leurs VE ne montre aucun effet sur la viabilité (Figure 45). Les iMSC montrent un potentiel anti-apoptotique plus élevé que leurs VE, tandis que les

mdMSC et leurs VE semblent avoir une efficacité similaire.

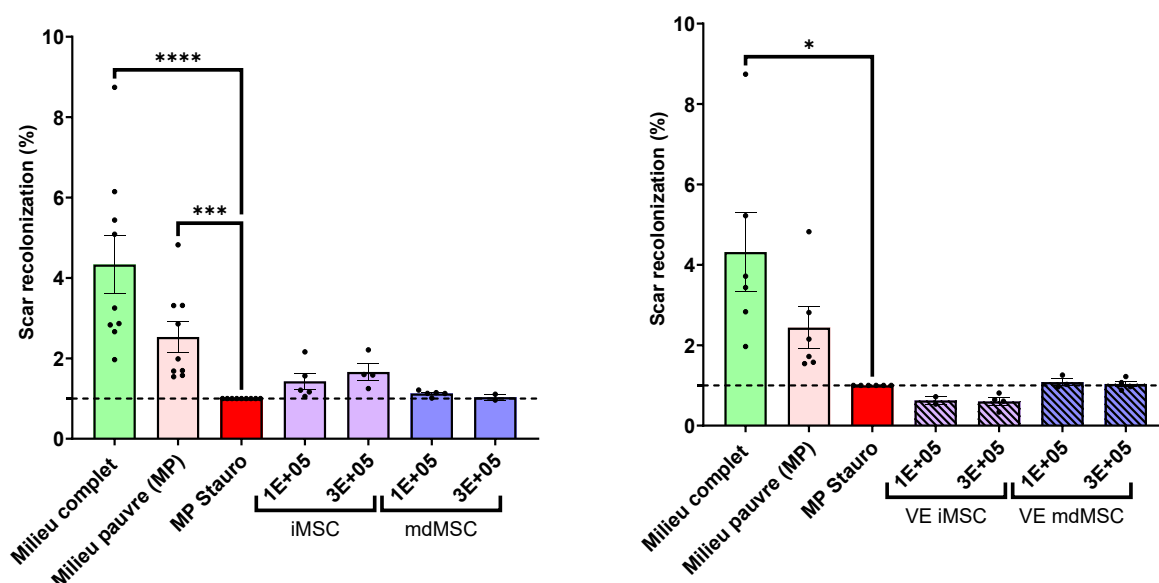


Figure 45 : Evaluation du potentiel anti-apoptotique des CSM (gauche) et des VE (droite) par test de viabilité p value $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,001$ (**), $\leq 0,0001$ (****) Kruskal-Wallis test avec correction par le test multiple de Dunnett

5. Choix de l'agent thérapeutique

A ce stade de l'avancée des travaux, la nécessité de choisir parmi les quatre agents thérapeutiques présélectionnés s'est imposée. La sélection s'est faite sur les trois critères précédemment étudiés : la caractérisation, le potentiel pro-angiogénique et le potentiel anti-apoptotique (Figure 46).

Dans un premier temps, les résultats obtenus montrent que les VE ont un potentiel thérapeutique égal ou inférieur aux CSM dans les deux tests de fonctionnalité réalisés. De plus, des étapes supplémentaires sont nécessaires à la production et l'isolement des VE ce qui augmente la durée et le coût de leur obtention. Ainsi les CSM ont été sélectionnées par rapport à ces critères scientifiques et logistiques.

Dans un second temps, la comparaison des différentes sources de CSM a montré que les mdMSC surpassent les iMSC en termes de capacité de cicatrisation, bien qu'elles soient légèrement moins performantes dans le test de viabilité cellulaire. Une caractérisation approfondie des deux lignées a révélé que les iMSC présentent un phénotype moins stable au fil du temps, marqué par la disparition de certains marqueurs de surface et l'expression progressive de facteurs de transcription associés à la pluripotence. Ces observations,

synthétisées dans la Figure 46, ont permis de comparer les deux populations cellulaires, désignant les mdMSC comme l'option la plus adaptée pour poursuivre le projet. Ces cellules sont donc les seules à avoir fait l'objet de tests *in vitro* complémentaires (fibrose et inflammation) puis d'une évaluation *in vivo*.

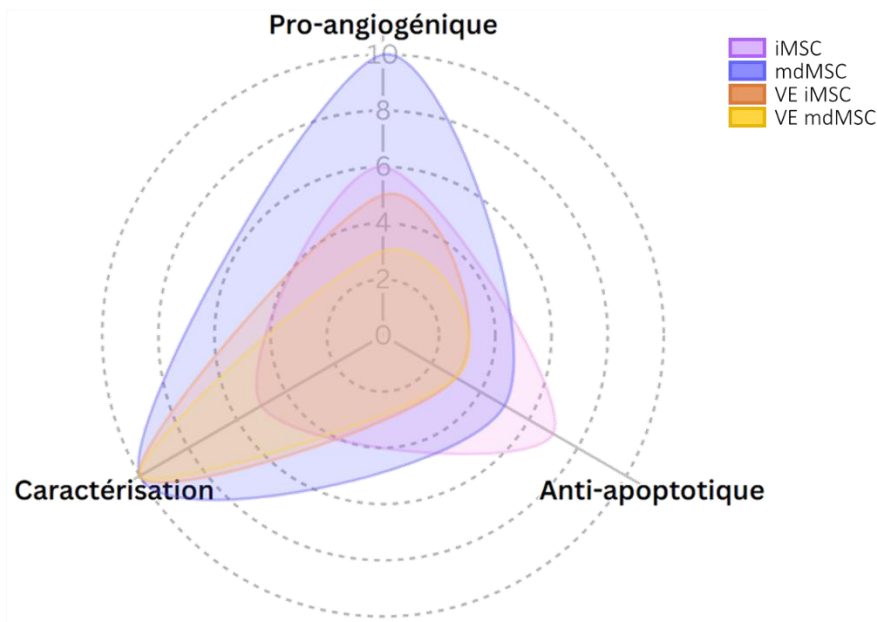


Figure 46 : Critères de sélection de l'agent thérapeutique selon 3 critères

5.1. Test de modulation de la fibrose

Le test de modulation de la fibrose a été mis au point pour déterminer le potentiel anti-fibrotique des mdMSC. Des fibroblastes cardiaques humains sont stimulés pour induire un phénotype pro-fibrotique, puis les mdMSC sont ajoutées afin d'évaluer leur capacité à le réduire.

Par immunomarquage (Figure 47), l'expression de la protéine α -SMA reste très faible dans les HCF non traités. Une déprivation en sérum induit une augmentation significative de cette expression par rapport à la condition non traitée, laquelle s'amplifie encore lors de la stimulation des HCF par une solution de TGF- β 1, L-asc et de DxS. En comparaison avec les HCF stimulés, l'ajout des mdMSC entraîne une diminution de l'expression de α -SMA.

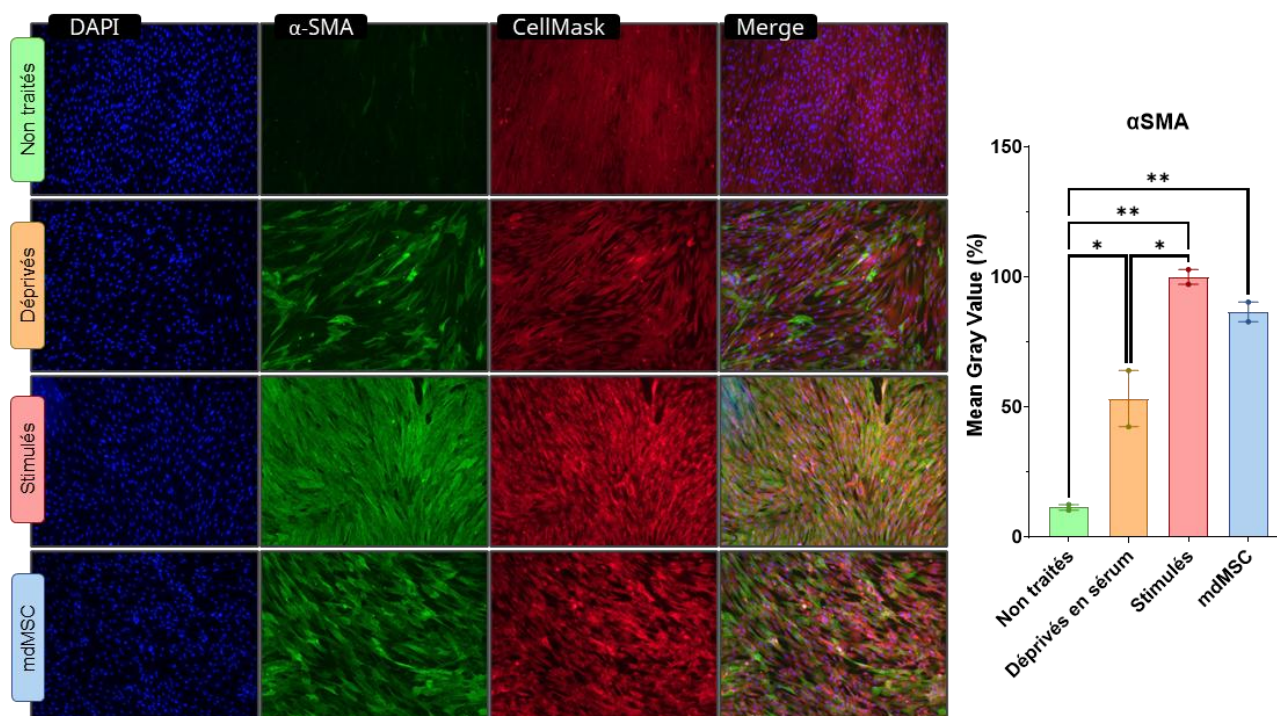


Figure 47 : Immunomarquage des fibroblastes cardiaques humains (HCF) pour détecter α -SMA (vert), les membranes cellulaire (rouge) et les noyaux (bleu). p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Dunnett ($n=2$).

A la suite de ces résultats, il paraissait pertinent d'étudier l'expression des gènes liés à la fibrose par les HCF.

La Figure 48 présente les résultats des analyses qPCR effectuées dans quatre conditions de culture, pour le gène de remodelage matriciel (*MMP2*) ainsi que les gènes codant pour la synthèse de périostine (*POSTN*), de fibronectine (*FN1*) et de fibres de collagène (*COL1a1*, *COL3a1*). Les données révèlent une augmentation significative de l'expression des gènes *MMP2*, *FN1*, *COL1a1* et *COL3a1* dans les conditions de déprivation en sérum et de stimulation par rapport à la condition contrôle des HCF non traités, alors que le gène *POSTN* demeure plus fortement exprimé dans la condition contrôle. Comparés aux HCF stimulés seuls, les HCF co-incubés avec les mdMSC présentent une diminution significative de l'expression de *COL1a1*, ainsi qu'une tendance à la baisse, mais non significative, pour *MMP2*, *POSTN*, *FN1* et *COL3a1*. Ces résultats suggèrent que l'ajout de mdMSC régule négativement l'ensemble des gènes associés au processus fibrotique.

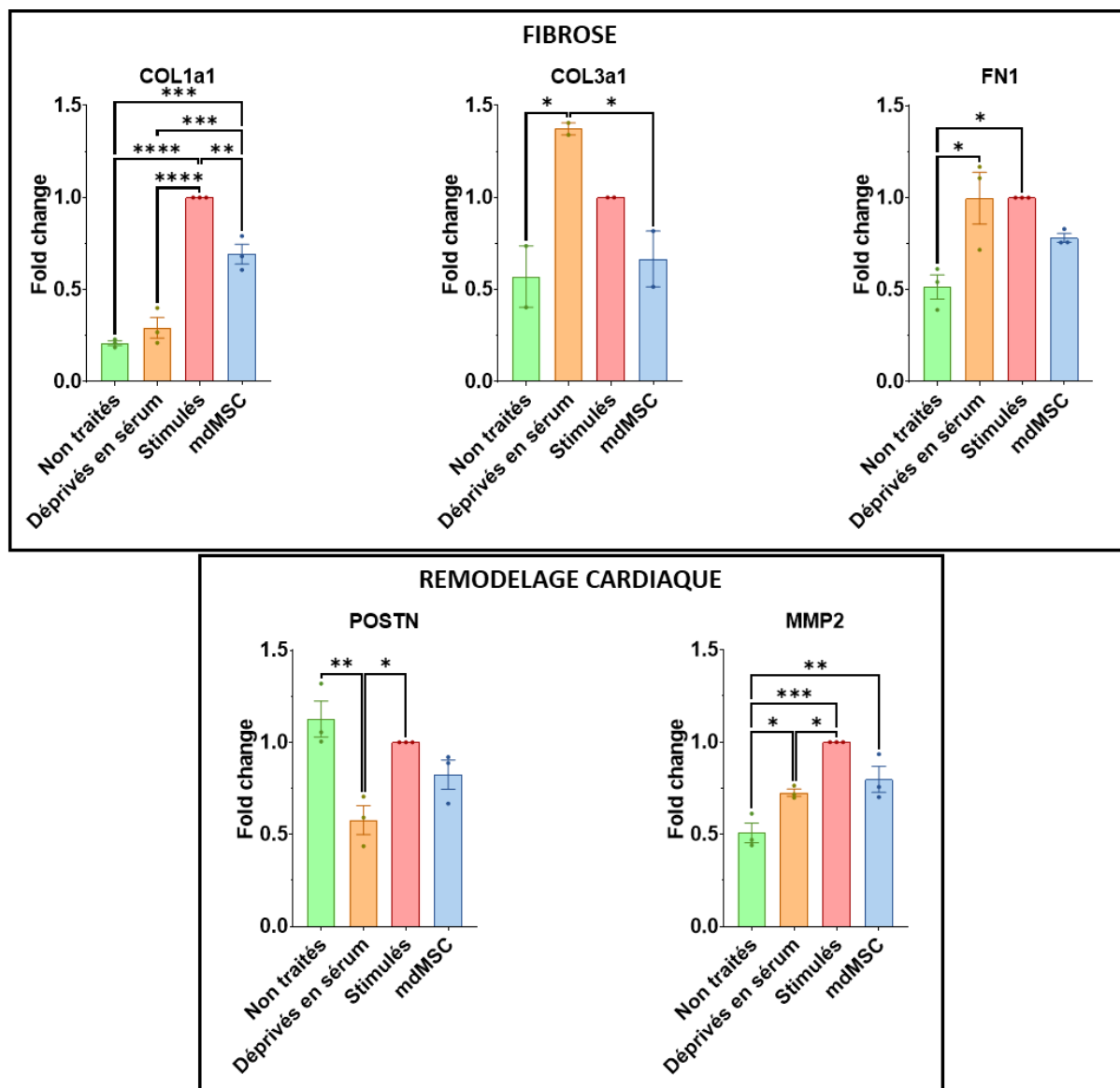


Figure 48 : Analyse de l'expression des gènes par qPCR impliqués dans la fibrose et le remodelage cardiaque par des fibroblastes cardiaques humains (HCF). p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey ($n=3$).

5.2. Test de modulation de l'inflammation

Le test de modulation de l'inflammation permet d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire des mdMSC.

Les monocytes humains (THP-1) sont stimulés avec du LPS pour induire la sécrétion de molécules inflammatoires, et les mdMSC sont ajoutées simultanément à cette stimulation. L'expression de TNF- α est significativement plus élevée dans la condition THP-1 stimulée par le LPS que dans la condition non traitée, où elle reste très faible. Une augmentation similaire est observée pour l'IL-10, bien que cette augmentation ne soit pas statistiquement

significative.

Une diminution non significative de la sécrétion de TNF- α est constatée dans le surnageant des THP-1 incubés avec du LPS et des mdMSC. En parallèle, une augmentation de la sécrétion d'IL-10 est également observée par rapport aux deux conditions contrôles, confirmant ainsi le rôle immunomodulateur des mdMSC (Figure 49).

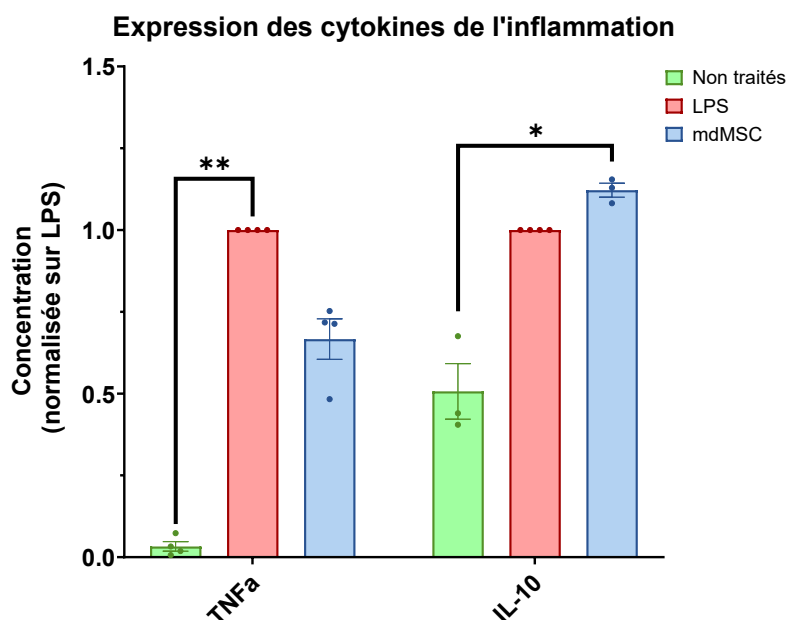


Figure 49 : Analyse de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF α (n=4) et anti-inflammatoires IL-10 (n=3) dans le surnageant de culture de monocytes humains (THP-1). p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Dunnett.

6. Caractérisation du patch cardiaque fonctionnalisé par les mdMSC

6.1. Propriétés mécaniques et rhéologiques

6.1.1. Test d'oscillation en amplitude

Afin de caractériser le collagène obtenu après bio-impression par extrusion, le comportement viscoélastique a été étudié par des tests d'oscillation en amplitude (Figure 50). Le point de croisement entre le module élastique (ou module de stockage G') et le module visqueux (ou module de perte G''), appelé contrainte critique, correspond à l'instant où G'' devient dominant et indique la contrainte oscillatoire au-delà de laquelle le collagène se rompt. Bien que le comportement viscoélastique du collagène fonctionnalisé ou non soit similaires, l'ajout de mdMSC entraîne une réduction de la contrainte à la rupture du matériau, passant de 39,8 % à 5,6 %. Cette diminution montre que le collagène bio-imprimé est plus fragile après fonctionnalisation avec les mdMSC.

La région où G' et G'' sont indépendants de la contrainte est appelée la LVR. Dans la LVR, les contraintes appliquées sont insuffisantes pour provoquer une rupture structurale, ce qui permet de mesurer d'importantes propriétés micro-structurelles.

Le test d'oscillation en amplitude permet de déterminer le pourcentage de contrainte que l'on peut appliquer pour se situer dans la LVR de notre matériau. Les prochains tests sont réalisés avec une contrainte de cisaillement de 0,5%.

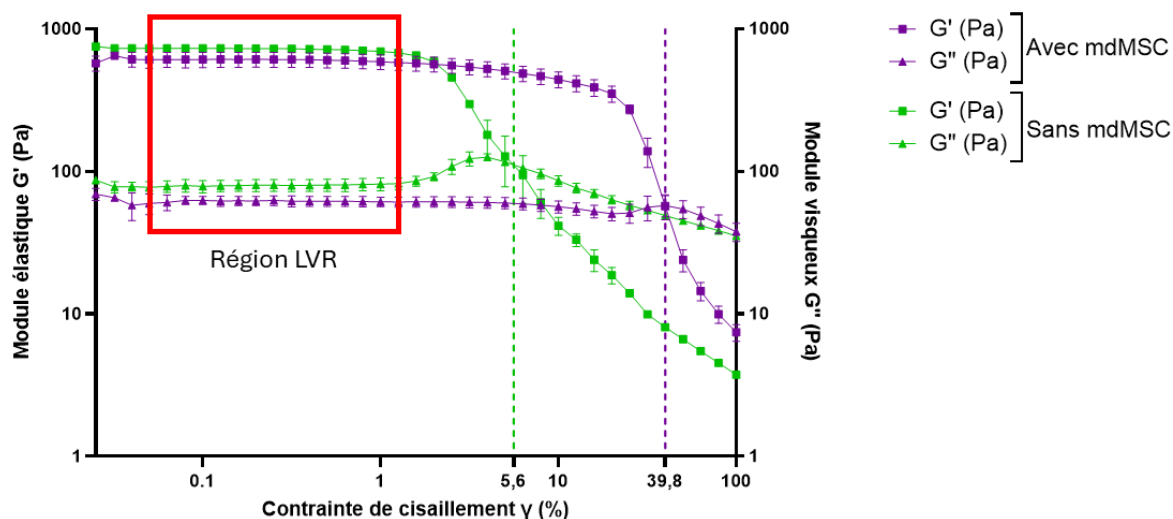


Figure 50 : Test d'oscillation en amplitude (fréquence = 1Hz) du collagène bio-imprimé fonctionnalisé ou non par des mdMSC

6.1.2. Test d'oscillation en fréquence

Afin de réaliser un test d'oscillation en fréquence dans la LVR, la contrainte d'oscillation a été fixée à 0,5%. La fréquence d'oscillation appliquée sur le collagène est progressivement augmentée pour mesurer les paramètres G' et G'' .

Le module élastique G' étant supérieur au module visqueux G'' , le comportement viscoélastique de notre matériau peut être décrit comme celui d'un solide élastique (Figure 51). L'ajout des cellules dans le collagène ne modifie donc pas son comportement viscoélastique.

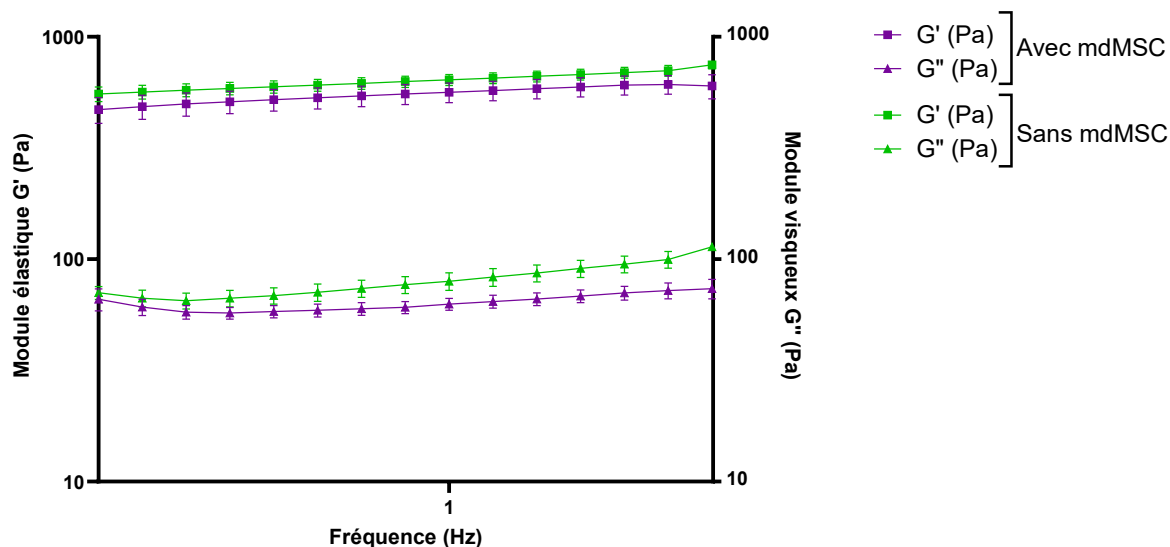


Figure 51 : Test d'oscillation en fréquence (contrainte = 0,5%) du collagène bio-imprimé fonctionnalisé ou non par des mdMSC

6.2. Caractéristiques des mdMSC incorporées dans le patch cardiaque

6.2.1. Viabilité des mdMSC après extrusion

La viabilité des mdMSC après extrusion a été vérifiée à J+3 par cytométrie en flux (Figure 52). Après 72h dans le collagène, le taux de viabilité cellulaire est maintenu à 94,6% et ce résultat est confirmé par le marquage des cellules mortes (dead+) qui montre un taux de mortalité faible de 3,04%.

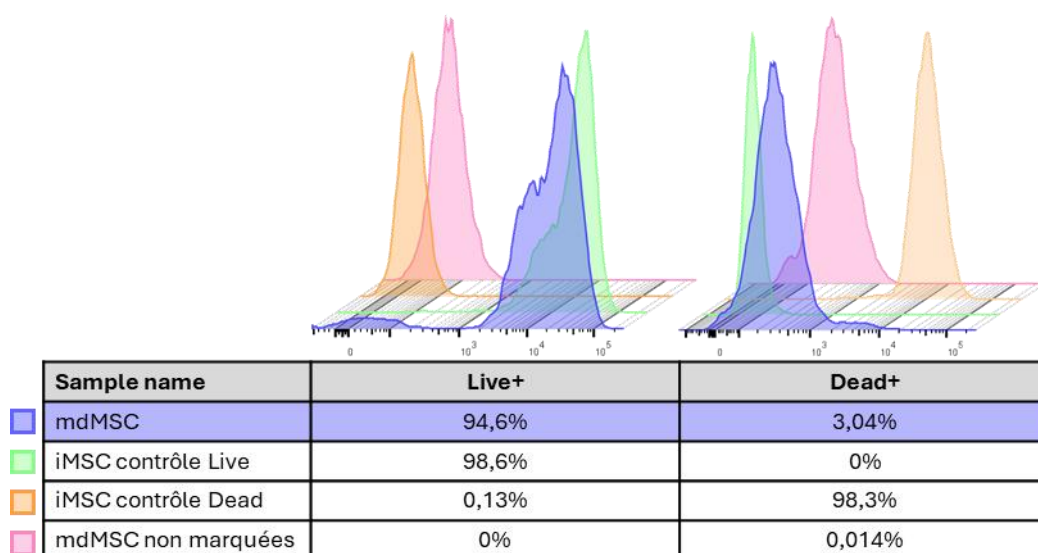


Figure 52 : Analyse par cytométrie en flux de la viabilité des mdMSC 3 jours après extrusion (en bleu : la population d'intérêt, en vert : le contrôle positif Live, en orange : le contrôle positif Dead, en rose : le contrôle négatif)

6.2.2. Test de potentiel thérapeutique

La viabilité cellulaire post-extrusion étant validée, les cellules ont été à nouveau testées pour leur potentiel pro-angiogénique. Le lendemain de l'impression, les cellules sont extraites du collagène et utilisées dans le test de cicatrisation précédemment décrit. L'analyse de la surface de la cicatrice montre une recolonisation de $\approx 18\%$ lorsque les HUVEC sont incubées avec les mdMSC bio-imprimées contre $\approx -26\%$ pour le milieu déprivé en sérum (Figure 53). Les mdMSC sont donc toujours fonctionnelles après leur bio-impression dans le patch de collagène

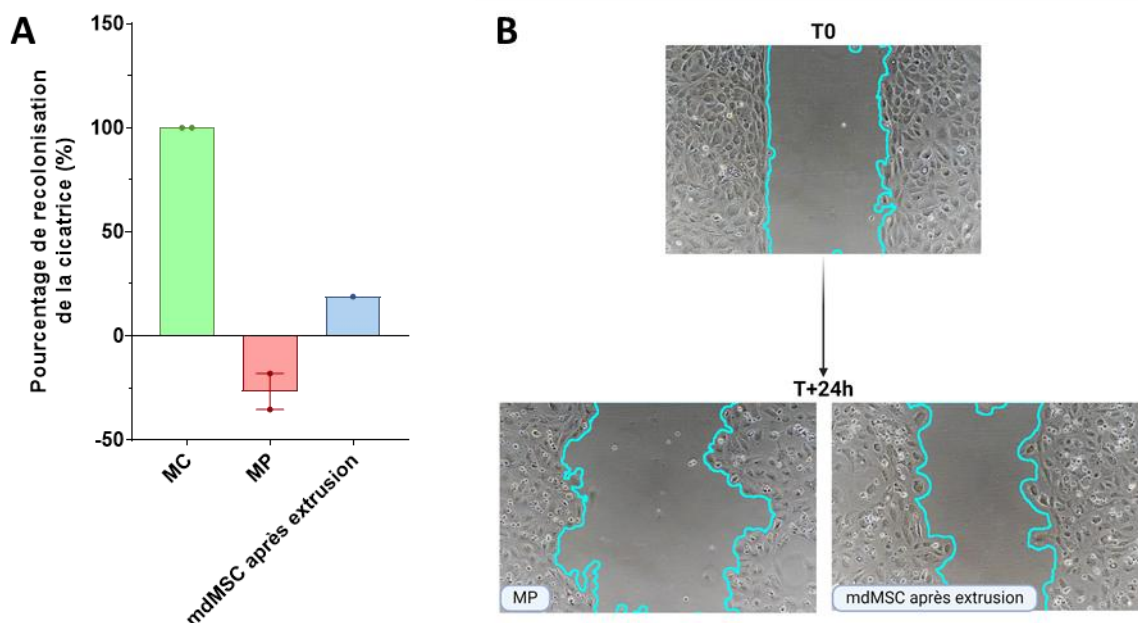


Figure 53 : Evaluation du potentiel pro-angiogénique des mdMSC 24h après extrusion et extraction du collagène. (A) Histogramme de la recolonisation de la cicatrice après 24h. (B) Photos des HUVEC à T0 et à T+24h après incubation des mdMSC

6.3. Stabilité et stockage du patch cardiaque

La stabilité du patch dans le temps ainsi que les conditions de stockage sont des paramètres importants pour son utilisation dans un cadre clinique. Les patches fonctionnalisés avec des mdMSC ont été stockés à TA et congelé à -20°C pour évaluer leur résistance et leur évolution.

6.3.1. Test de stabilité

La conservation des patches à TA a été évaluée afin de déterminer le temps de stockage

envisageable avant implantation. Le poids et l'épaisseur de patches de $0,8\text{cm}^2$ (échantillons implantés) et de 2cm^2 (échantillons utilisés pour les tests rhéologiques) sont évalués tous les jours pendant 4 jours (Figure 54). Quel que soit la taille des patches, l'épaisseur diminue de $\approx 17\%$ après 24h puis de $\approx 35\%$ les jours suivants jusqu'à devenir trop fine pour être mesurée. Les courbes de poids suivent la même tendance avec une diminution de $\approx 22\%$ après 24h, puis $\approx 27\%$ après 48h et $\approx 36\%$ après 72h. Afin de garder l'épaisseur maximale lors de l'implantation, les patches seront utilisés 24h à 48h après bio-impression.

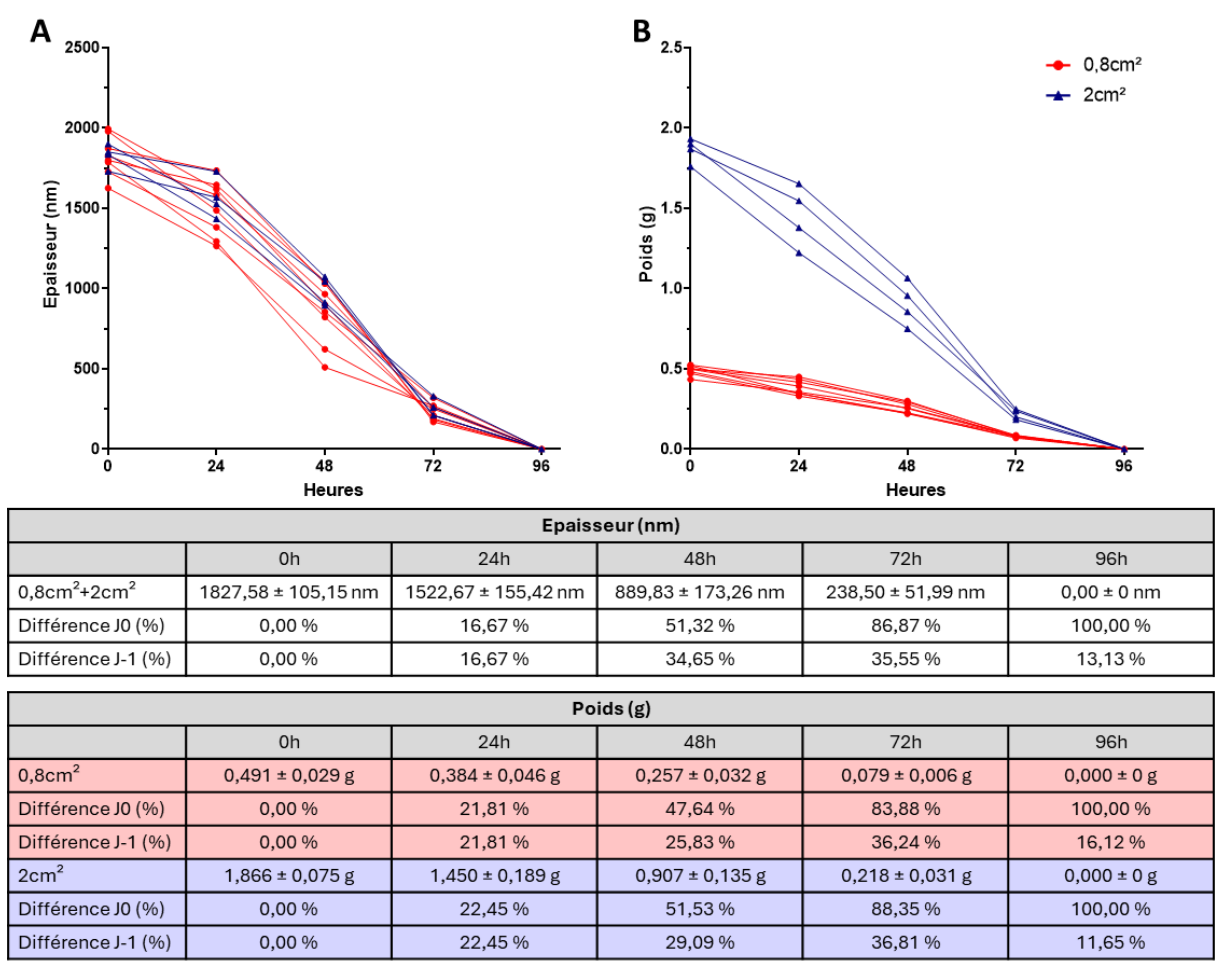


Figure 54 : Mesures de l'évolution (A) de l'épaisseur et (B) du poids des patches de collagène de $0,8\text{cm}^2$ et de 2cm^2 dans le temps

6.3.2. Test de congélation

La viabilité des mdMSC après extrusion puis congélation des patches a été vérifiée par cytométrie en flux à T0 après décongélation (Figure 55A) et après 24h de décongélation sur un gel d'agarose (Figure 55B) contenant du milieu de culture.

Mesuré après décongélation, le taux de viabilité cellulaire est de $\approx 67\%$ soit 30% de moins que

les patches non congelés (Figure 52). Ce taux diminue jusqu'à 60% si les patches sont laissés 24h à TA sur un gel d'agarose contenant du milieu de culture après la décongélation. De plus, l'épaisseur des patches congelés puis décongelés est fortement diminuée en comparaison avec les patches « frais ».

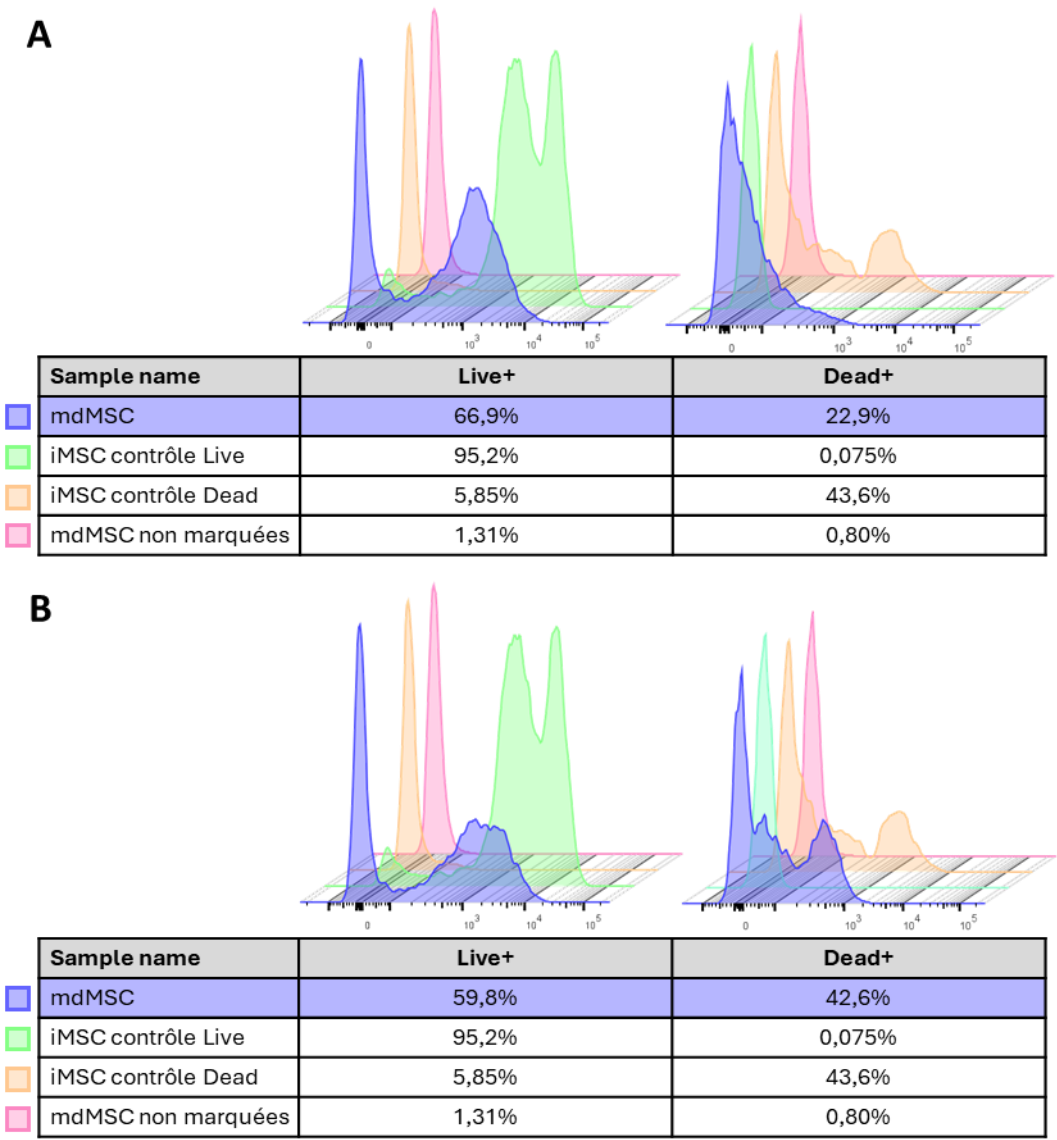


Figure 55 : Analyse par cytométrie en flux de la viabilité des mdMSC après extrusion et congélation (en bleu : la population d'intérêt, en vert: le contrôle positif Live, en orange : le contrôle positif Dead, en rose: le contrôle négatif). (A) T0 après décongélation. (B) T24 après décongélation

7. Evaluation *in vivo* du patch cardiaque

Les résultats précédents sur le stockage des patches ont permis de préciser le délai d'implantation du patch qui est donc implanté 24h à 48h après l'impression pour maximiser la viabilité cellulaire, l'épaisseur du collagène et donc l'effet thérapeutique escompté sur le site d'implantation.

7.1. Evaluation de la fonction cardiaque

Soixante-dix rats ont été opérés. Le taux de mortalité global était de 17 %, avec une répartition de 83 % pour la période peropératoire et de 17 % pour la période postopératoire. Parmi les rats qui survivaient à 1 mois et ont été analysés échocardiographiquement, 27 ont été exclus en raison d'une FEVG supérieure à 60%. Ce sont donc au total 31 rats qui ont pu être inclus et se répartissent ainsi : sham, n=10 ; patch, n= 10 et patch+mdMSC, n=11.

Les mesures finales ont été réalisées un mois après les implantations. Le groupe sham présente une détérioration significative de la FEVG au cours du temps (Figure 56). Au contraire, dans les groupes traités, la FEVG se stabilise lorsque les patches sont non fonctionnalisés et augmentent lorsqu'ils contiennent des mdMSC.

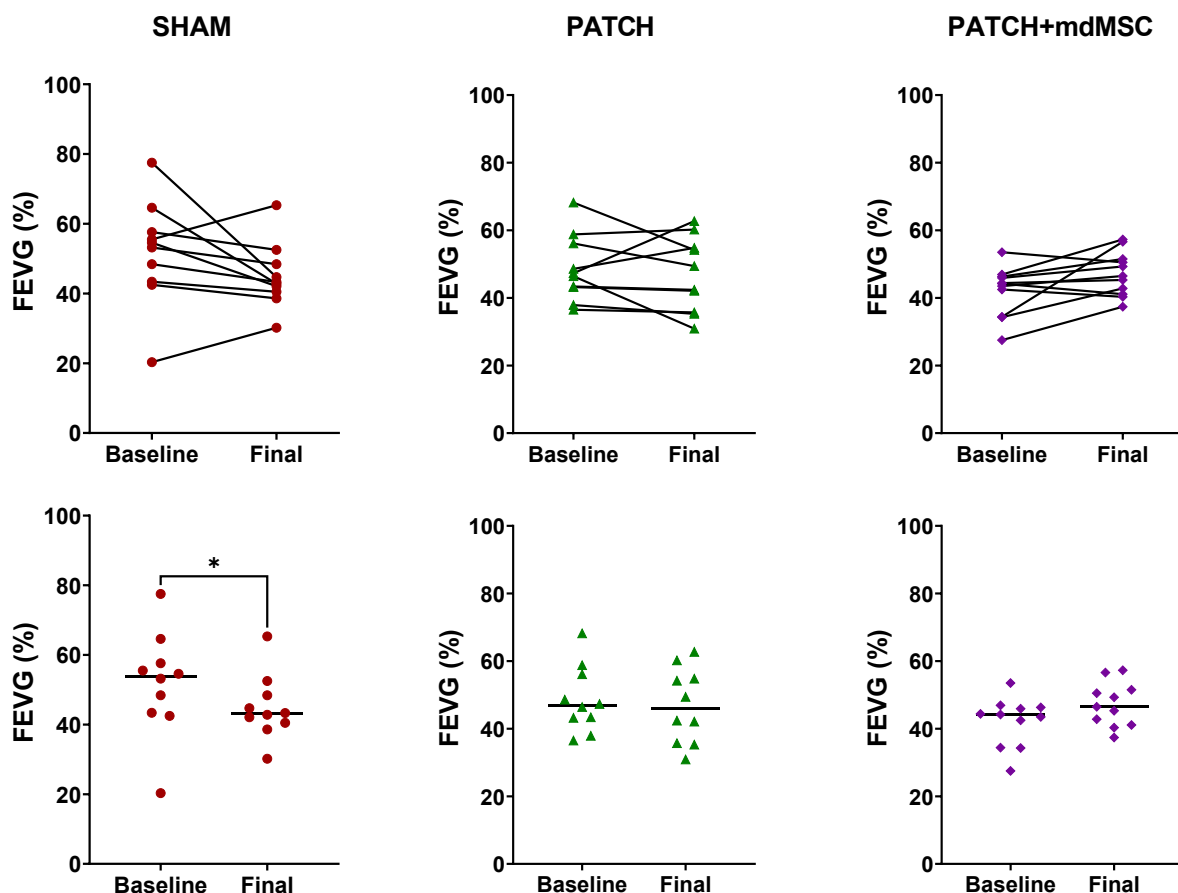


Figure 56 : Trajectoires individuelles de la FEVG des mesures de base (avant traitement) aux mesures finales (après traitement) des trois groupes d'animaux. p value : $\leq 0,05$ (*) Repeated measures two-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey.

Un mois après implantation des patches (mesure finale), la FEVG est diminuée de $7,6 \pm 8,1\%$ dans le groupe sham contre seulement $3,2 \pm 5,6\%$ dans le groupe patch seul. En revanche, elle augmente significativement de $14,3 \pm 6,5\%$ (vs. le groupe sham) lorsque le patch est fonctionnalisé avec les mdMSC (Figure 57A). Ces évolutions de FEVG dans les groupes traités reflètent celles des volumes ventriculaires ; ainsi, alors que les VTS augmentent considérablement dans le groupe sham ($70,3\%$), cette augmentation est nettement moins importante après implantation des patches, avec ou sans cellules ($9,1\%$ et $14,3\%$, respectivement), la différence étant significative avec le groupe contrôle (Figure 57B). Cette même tendance est observée pour les VTD mais n'est significative que pour le groupe patch seul (Figure 57C).

Ces volumes permettent de calculer le VES qui est significativement augmenté dans le groupe patch+mdMSC entre la mesure baseline et finale (Figure 57D).

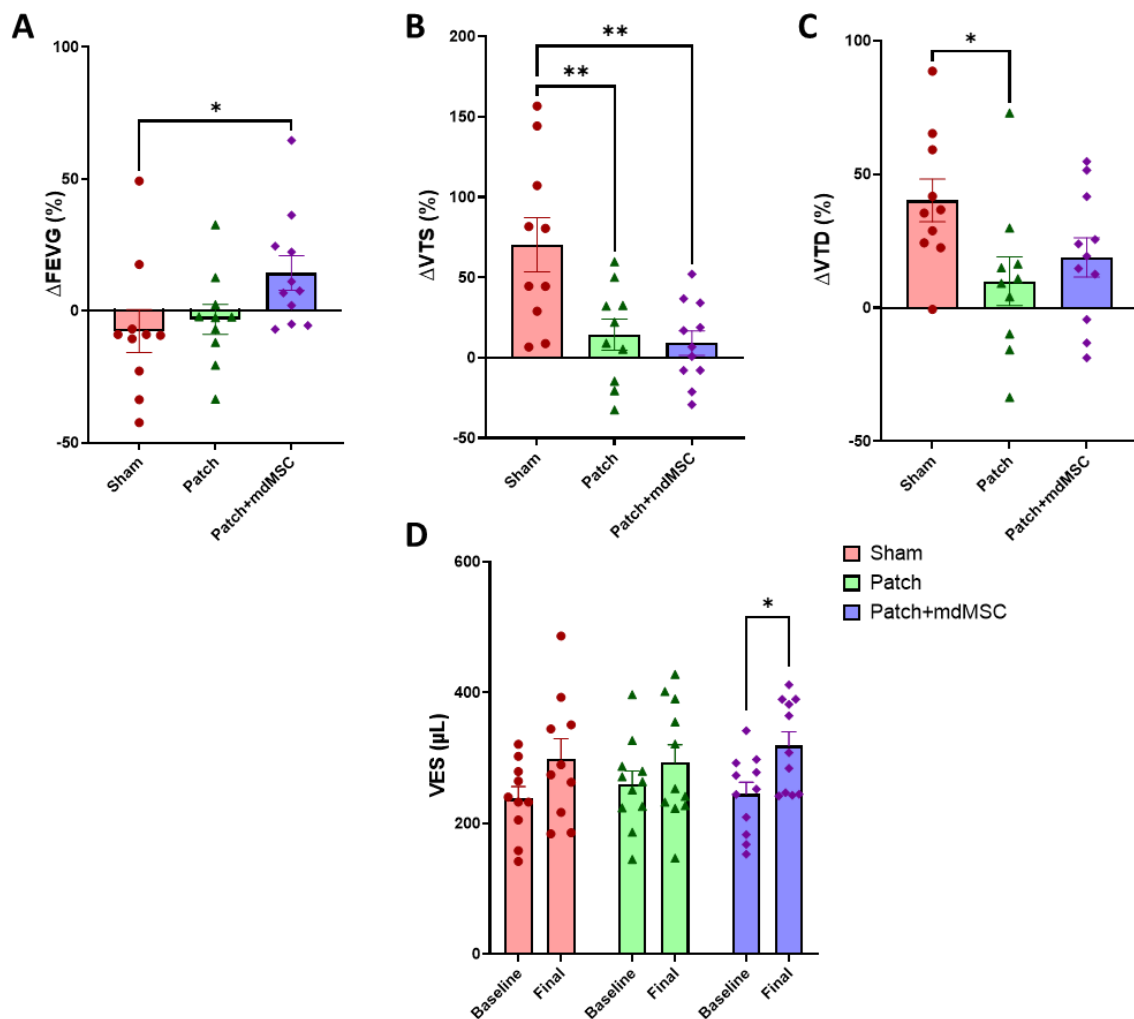


Figure 57 : Evolution des volumes ventriculaires gauches (**B**) VTS et (**C**) VTD permettant de calculer la (**A**) FEVG et le (**D**) VES. *p* value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) - (A) Kruskal-Wallis test avec correction par le test multiple de Dunnett, (B-

C) Ordinary one-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey, (D) Repeated measures two-way ANOVA avec correction par le test multiple de Tukey.

L'indice d de Cohen a été calculé pour mesurer la taille de l'effet (différence entre deux moyennes), indépendamment de la taille des échantillons. Les groupes d'animaux traités (patch et patch+mdMSC) ont été comparés au groupe contrôle sham. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6. Le groupe patch sans cellules présente un indice d de Cohen de 0,2, ce qui correspond à un effet de faible taille; la différence entre les groupes est donc modeste, mais mesurable. En revanche, l'indice d de Cohen atteint 0,93 pour le groupe patch+mdMSC, ce qui indique un effet taille important, traduisant une différence marquée entre les groupes. Ces résultats viennent appuyer les données obtenues par l'analyse statistique fréquentiste habituelle et soulignent donc une différence notable de la fonction cardiaque chez les rats traités comparativement aux témoins.

	Sham	Patch	Patch+mdMSC
Nombre de valeurs	10	10	11
Valeurs de ΔFEVG (différence entre mesure de base et finale)	-22,78%	-2,19%	2,12%
	-42,33%	-20,54%	24,56%
	-8,93%	12,61%	-5,54%
	-33,65%	-2,51%	11,11%
	17,60%	2,43%	6,81%
	-8,96%	-11,94%	-7,00%
	-10,54%	-6,86%	-4,99%
	-6,87%	-33,42%	7,60%
	-9,25%	32,66%	22,33%
	49,25%	-2,30%	64,65%
			36,27%
Moyenne	-7,65	-3,21	14,36
SD	25,82	17,87	21,60
Moyenne1-Moyenne2		4,44	22,00
SD groupés		22,20	23,69
Indice d de Cohen		0,20	0,93
Taille d'effet		Petite	Grande

Tableau 6 : Mesure de la taille d'effet par l'indice d de Cohen des groupes de rats traités (patch et patch+mdMSC) versus non traités (sham)

7.2. Analyses histologiques

La coloration au trichrome de Masson permet de calculer le rapport de la surface infarctée sur la surface totale des coupes de cœurs (Figure 58A). Aucune différence n'est observée entre les groupes et les valeurs obtenues sont très dispersées (Figure 58B). En revanche, il existe une

corrélation négative significative pour tous les groupes entre la taille de la cicatrice et la FEVG de base pour tous les groupes (Figure 58C) qui valide donc l’observation classique d’une relation entre la taille de l’infarctus et la détérioration de la fonction ventriculaire gauche.

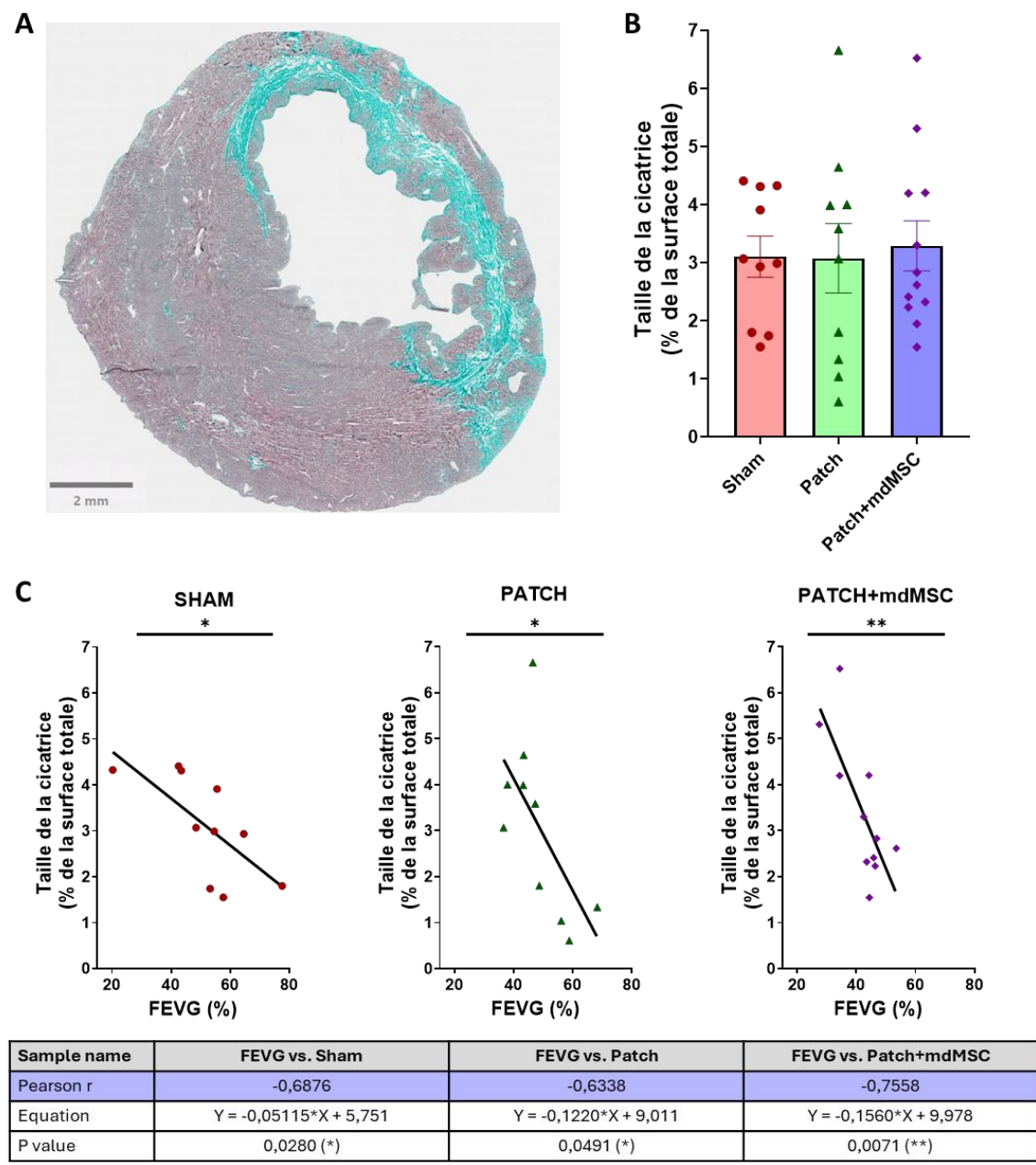


Figure 58 : Analyse de la taille de la cicatrice sur les coupes des cœurs infarctés. **(A)** Image de la coloration au trichrome de Masson (barre d'échelle = 2mm). **(B)** Histogramme de la taille de la cicatrice en fonction des groupes de traitement. **(C)** Courbe de corrélation entre la taille de la cicatrice et la FEVG. p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) Corrélation de Pearson.

La coloration au rouge Sirius permet de distinguer les fibres de collagène, en mettant en évidence le collagène interstitiel (sain), plus clair, par rapport au collagène dense (pathologique) caractéristique de la cicatrice post-infarctus (Figure 58A). L’analyse quantitative

réalisée à l'aide du logiciel FIBER ne met en évidence aucune différence significative entre les groupes (Figure 58B).

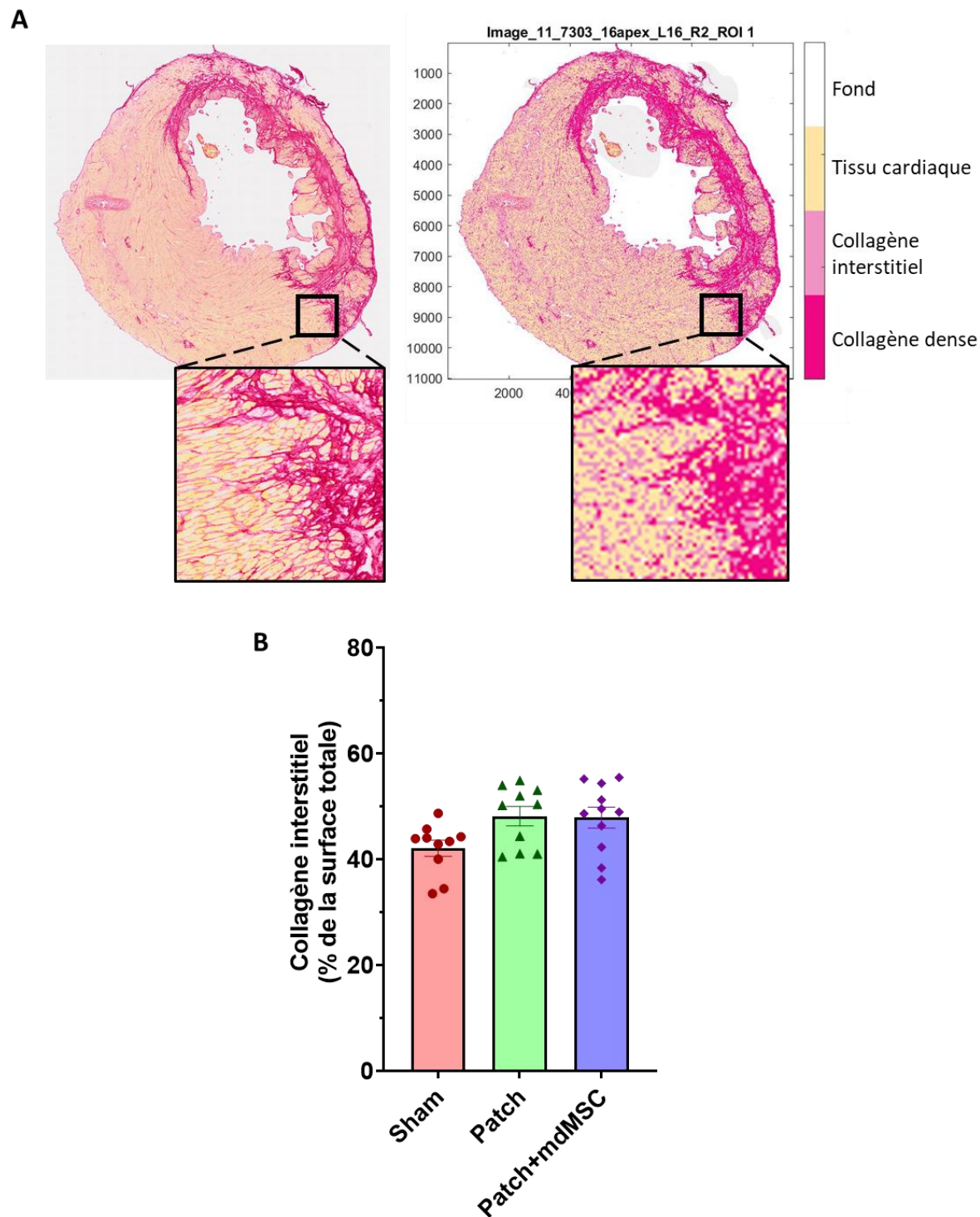


Figure 59 : Quantification du collagène interstitiel sur les coupes des cœurs infarctés. (A) Image de la coloration au rouge Sirius (gauche) et de l'analyse par le logiciel FIBER (droit). (B) Histogramme de la quantification du collagène interstitiel en fonction des groupes de traitement.

L'antigène RECA-1 est un marqueur spécifique des cellules endothéliales chez le rat et permet

la visualisation des vaisseaux sanguins (Figure 60A et Figure 60B). L'analyse quantitative de l'angiogenèse à l'aide du logiciel FIBER ne révèle aucune différence significative entre les groupes expérimentaux (Figure 60C).

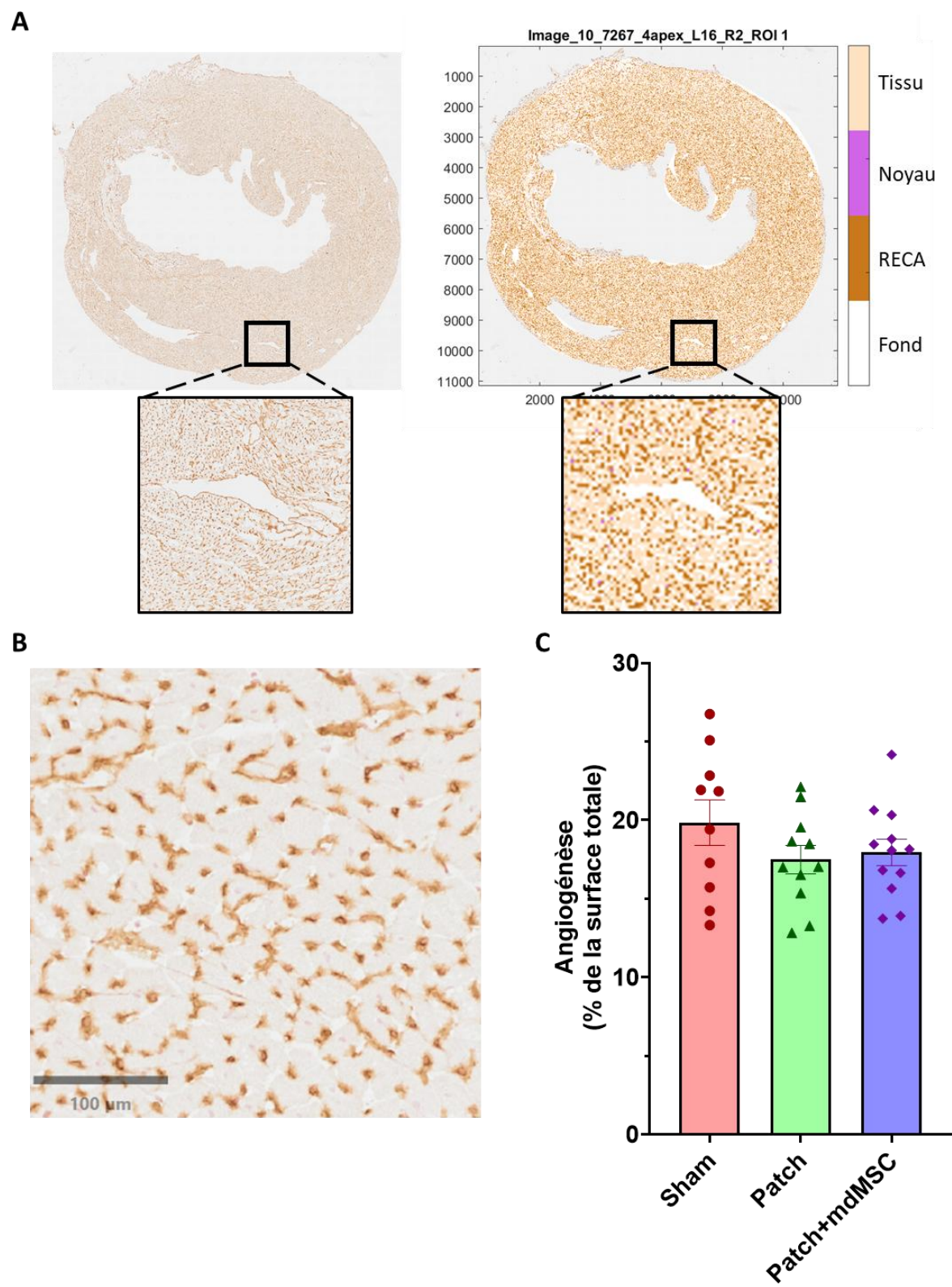


Figure 60 : Analyse de la taille de l'angiogenèse sur les coupes des cœurs infarctés. (A) Image de l'immunomarquage de l'antigène de surface RECA-1 (gauche) et de l'analyse par le logiciel FIBER (droit). (C)

7.3. Analyses transcriptomiques

Pour tenter d'expliquer l'amélioration de la fonction cardiaque dans les groupes traités avec ou sans cellules, les transcrits des cœurs sont analysés par RT-qPCR et les résultats sont montrés dans la Figure 61. L'expression des gènes est exprimée en variations d'expression par rapport à la condition contrôle sham. Les résultats mettent en évidence une réduction significative de l'expression de *Nppb*, gène biomarqueur de l'IC, dans le groupe traité par patch+mdMSC. Plus récemment, *Ddah1*, émerge comme un nouveau marqueur potentiel de l'IC. Comme le suggèrent Witt et al., l'expression de *DDAH1* est significativement plus élevée chez les patients présentant une FEVG réduite et un diamètre ventriculaire gauche augmenté (165). Ces observations sont en accord avec nos résultats qui montrent que les rats ayant reçu le patch cellularisé présentent une diminution significative de l'expression de *Ddah1*, cohérente avec l'amélioration de leur fonction. Une tendance similaire est retrouvée pour les gènes *Fn1*, *Plod2*, *Col1a1* et *Col3a1* impliqués dans le processus de fibrose, bien que les différences entre les groupes ne soient pas significatives. La diminution de *Fn1* et *Col1a1* est toutefois plus importante lorsque le patch de collagène est fonctionnalisé avec les mdMSC. Pour confirmer la capacité immunomodulatrice du traitement, quatre gènes de l'inflammation ont aussi été évalués. Une baisse significative de l'expression de *Cxcl11* et *Cxcl9* est observée dans le groupe patch+mdMSC par rapport aux sham, tandis qu'une diminution, non significative mais notable, est également mesurée dans le groupe patch. Ces deux chimiokines sont de plus en plus reconnues dans la littérature scientifique comme des marqueurs d'activation inflammatoire associés à la dysfonction ventriculaire gauche (166,167). Une tendance similaire, bien que non significative, est relevée pour le gène *Ly6c*. À l'inverse, le groupe patch a-cellulaire présente une augmentation importante de l'expression du gène *Ptgs2*, qui est au contraire diminuée dans le groupe traité avec le patch+mdMSC. Par ailleurs, la réduction de l'expression d'*Errfi1*, gène induisant l'apoptose, est plus importante dans les groupes traités que dans le groupe sham et significative pour le groupe patch+mdMSC. En revanche, aucune amélioration n'est observée pour les gènes impliqués dans le remodelage cardiaque, tels que *Postn* et *Thbs1*.

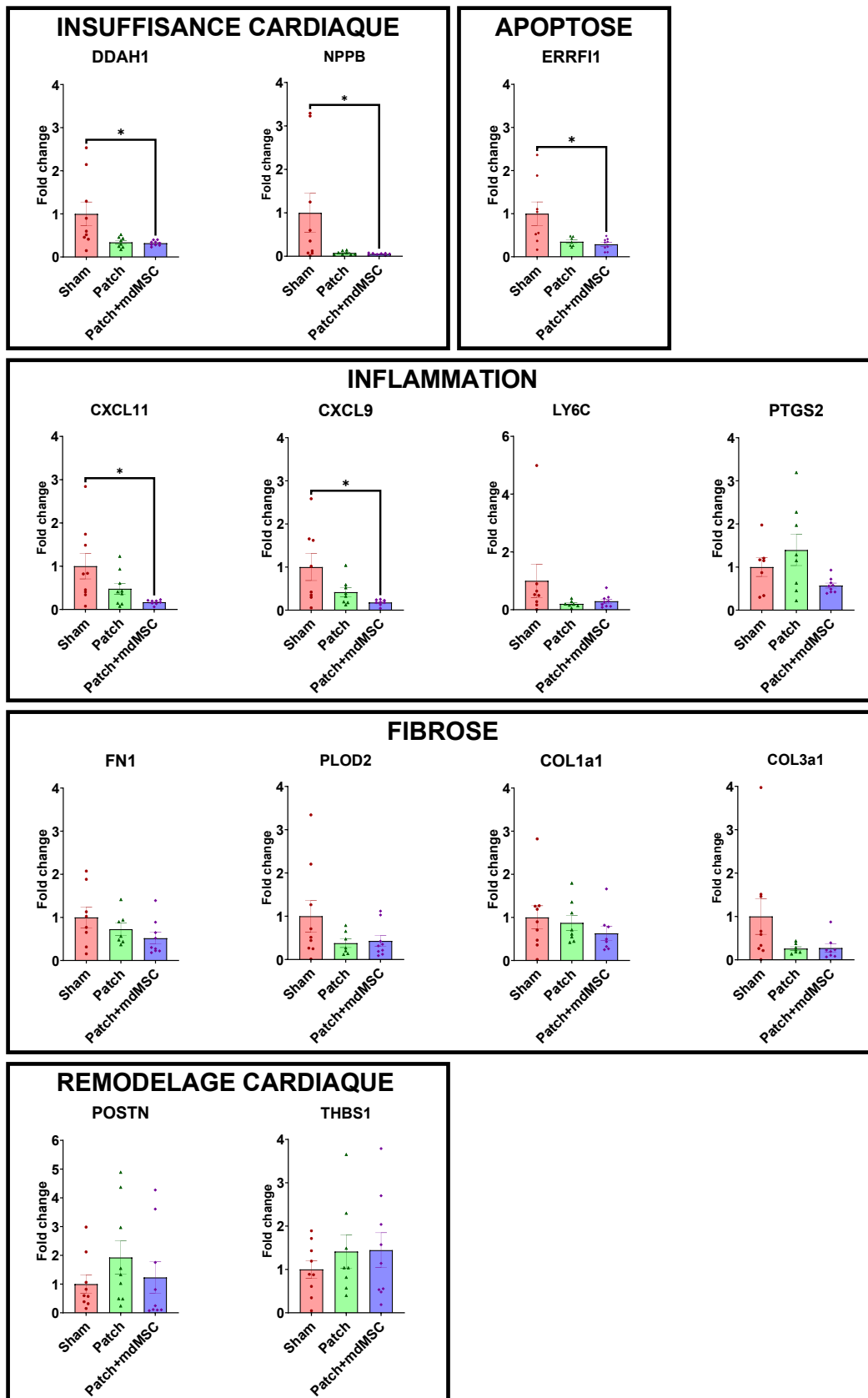


Figure 61 : Analyse de l'expression de gènes impliqué dans l'insuffisance cardiaque (DDAH1, NPPB), l'apoptose (ERRF1), l'inflammation (CXCL11, CXCL9, LY6C, PTGS2), la fibrose (FN1, PLOD2, COL1A1, COL3A1) et le remodelage cardiaque (POSTN, THBS1) par RT-qPCR dans les groupes sham, patch et patch+mdMSC comprenant respectivement 8, 7 et 9 animaux. p value $\leq 0,05$ (*) Kruskal-Wallis test avec correction par le test multiple de Dunnnett.

Discussion

1. Rationnel de l'étude

Les CSM et leurs VE sont déjà largement utilisés en thérapie régénérative. Ainsi une revue récente des essais cliniques en a-t-elle recensé plus de 2000, majoritairement en phases 1 et 2, conduites en Asie et intéressant pratiquement toutes les pathologies (168). Les maladies cardiaques ne représentent toutefois qu'une fraction limitée de ces essais, 63 sur 1014 compilés dans une autre revue (169). En ce qui concerne les VE, 40 essais cliniques (contre plus de 9000 études *in vitro* ou animales) ont été identifiées dans une étude récente de la littérature avec les CSM comme sources des vésicules dans 65% des cas (170) mais seulement deux essais cliniques en cours, l'un dans l'infarctus du myocarde (avec des VE d'origine plaquettaire ; cette étude est supposée être en cours mais n'est pas répertoriée dans la base de données ClinicalTrials.gov) et l'autre (SECRET-HF, NCT05774509 (171)), dans l'insuffisance cardiaque (avec des VE de cellules progénitrices cardio-vasculaires différenciées à partir d'iPSC). Le site ClinicalTrials.gov mentionne 2 autres essais (utilisant tous deux des VE dérivées de CSM mais sans aucune précision sur leur protocole et leur statut).

L'intérêt des CSM s'explique par leurs avantages pratiques (relative facilité d'obtention, potentiel d'expansion en culture) et leurs propriétés biologiques (angiogéniques, anti-inflammatoires et immuno-modulatrices) qui favorisent la réparation des tissus endommagés dans diverses pathologies cardiaque (172,173). Parallèlement, les VE, en tant que vecteurs de communication intercellulaire, transfèrent aux cellules cibles des molécules bioactives et des facteurs trophiques essentiels, reproduisant ainsi de nombreux effets bénéfiques des CSM tout en réduisant certains obstacles liés à l'utilisation de cellules entières, notamment celui d'une prolifération incontrôlée (174,175). L'introduction des VE en clinique est trop récente pour que l'on puisse évaluer leur efficacité ; en ce qui concerne les CSM, les résultats des grands essais sont variables, ce que peut expliquer la diversité des sources cellulaires, des procédures de préparation, des doses et des voies d'administration, avec toutefois un signal en faveur d'une augmentation de la FEVG chez les patients traités (176). En revanche, ce qui semble établi est l'excellente tolérance tant aux CSM (177) qu'aux EV (178).

Dans la pratique, les 3 principales sources de CSM sont la moelle sanguine, le tissu adipeux et la gelée de Wharton du cordon ombilical, les autres origines (placenta, pulpe dentaire, fibroblastes gingivaux) n'occupant qu'une place marginale. Ces trois sources

principales posent des problèmes distincts : la moelle et le tissu adipeux ont l'avantage d'une origine autologue mais leur prélèvement n'est pas complètement inoffensif ; les CSM de la gelée de Wharton sont faciles à récupérer et leur origine allogénique ne déclenche apparemment pas de réponse immune mais elles ont une fonctionnalité variable d'un cordon à l'autre. Il est en revanche un tissu potentiellement donneur de CSM dont nous n'avons trouvé nulle trace dans la littérature, expérimentale ou clinique : le muscle squelettique.

L'intérêt potentiel de cette source de CSM a été souligné par des travaux d'un laboratoire universitaire de Liège orienté vers la médecine régénératrice vétérinaire et qui a mis au point une technique de micro-biopsie (utilisée avec succès chez le cheval, le porc, le chien mais aussi l'homme) permettant d'obtenir des cellules ayant les caractéristiques classiques des CSM, incluant notamment des propriétés immunomodulatrices, au prix d'un prélèvement de très petit volume (15-20 mg) et cultivables selon un processus qui permet de réduire le nombre d'étapes manuelles et donc les sources potentielles de contamination (179,180).

Au-delà des avantages d'une origine autologue et d'une technique d'obtention très peu invasive, ces cellules semblent également capables d'être cultivées jusqu'à un plus grand nombre de passages (8) que leurs homologues d'autres sources sans perdre leurs propriétés pour cause de sénescence. Pour ces différentes raisons, il nous a semblé intéressant de les étudier dans le contexte d'une réparation cardiaque après un épisode ischémique. Elles nous ont été fournies par la société Revatis, start-up issue du laboratoire belge.

Qu'elles soient d'origine autologue ou allogénique, l'une des limites à l'utilisation des CSM, qui explique sans doute en bonne partie l'hétérogénéité des résultats cliniques, est la variation inter-individuelle de leur fonctionnalité. Ce problème peut être réglé par le recours soit à des cellules immortalisées, ce qui est possible en clinique (Stratagraft®) mais peut poser des risques sécuritaires, soit à des CSM dérivées d'une lignée bien définie de cellules souches pluripotentes, en pratique des iPSC. Plusieurs travaux ont été consacrés à ces cellules qui sont déjà testées en clinique, dans la réaction du greffon contre l'hôte (181), l'ostéo-arthrite (essai SCUpTOR) et les plaies diabétiques. Nous avons donc choisi les CSM dérivées d'iPSC comme le second type cellulaire à tester en parallèle ces mdMSC.

Le premier objectif de cette étude a donc été d'explorer deux sources alternatives de CSM susceptibles d'améliorer l'accessibilité des cellules tout en minimisant l'hétérogénéité des lots : Les CSM provenant de muscles squelettiques (mdMSC) et les CSM provenant de

cellules souches pluripotentes induites (iMSC). Le deuxième objectif a été de comparer ces cellules avec leurs produits sécrétés, qui sont en grande partie conditionnés dans des VE. Une fois identifié le candidat thérapeutique le plus efficace par des tests *in vitro*, nous avons cherché à le valider dans un modèle d'IM chez le rat. Compte tenu des limites des injections intramyocardiques, l'administration du candidat thérapeutique retenu a été réalisée par la délivrance épicaudique d'un patch bio-imprimé.

2. Caractérisation et effets thérapeutiques des CSM et des VE *in vitro*

Nous avons évalué le potentiel des CSM et de leurs VE en utilisant deux critères principaux : la caractérisation phénotypique et la bioactivité. Parmi les populations de CSM, seules les mdMSC ont satisfait aux critères minimaux établis par l'ISCT — à savoir l'adhésion au plastique, l'expression de marqueurs spécifiques aux CSM et la capacité de différenciation pluripotente (163). Les iMSC ont été définies selon ces mêmes critères, sans tenir compte initialement de leur origine unique par rapport aux CSM primaires. Toutefois, afin de définir plus rigoureusement les iMSC, Choudhery et al. proposent un ensemble étendu de critères minimaux devant inclure : [1] une morphologie fusiforme, [2] l'adhésion au plastique, [3] l'expression positive des marqueurs spécifiques aux CSM associée à l'absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques, [4] l'absence d'expression des facteurs d'induction des iPSC, [5] la capacité de différenciation en trois lignées, [6] absence de capacité à former des tératomes, et [7] la libération de facteurs paracrines pertinents pour les CSM (182). Dans notre étude, les critères [6] et [7] n'ont pas été vérifiés. En revanche, les iMSC utilisées dans cette étude ne satisfont pas aux critères [3] et [4] en raison de la perte des marqueurs spécifiques aux MSC et de l'apparition de facteurs de transcription associés à la pluripotence, respectivement. Ces modifications témoignent d'un changement de phénotype, rendant les iMSC problématiques pour des applications *in vivo*. Il est à noter que ces cellules provenaient de lots commerciaux et que, sans que l'on en sache la raison, la société qui les développée (FujiCDI) a, depuis le début de cette thèse, interrompu leur fabrication. Il a donc été décidé pour la suite des études *in vitro* puis pour l'évaluation dans un modèle animal de se concentrer sur les mdMSC.

Parallèlement à l'étude comparative des deux types cellulaires initialement choisis, les VE dérivées des iMSC et des mdMSC ont été caractérisées conformément aux directives

MISEV2018 (60). En effet, par rapport aux cellules-mères, les VE présentant des avantages cliniquement attractifs, notamment la possibilité (1) d'une production standardisée s'alignant mieux sur celle d'un médicament et (2) d'une stabilité à -80°C compatible avec une disponibilité immédiate, à la demande. Toutefois, alors que des études antérieures ont démontré que les VE récapitulent, voire surpassent, les effets des cellules parentes (183) ce constat n'a pas été confirmé dans notre étude. Toutefois, alors que des études antérieures ont démontré que les VE récapitulent, voire surpassent, les effets des cellules parentes (183) ce constat n'a pas été confirmé dans notre étude. Nous n'avons à ce stade que des hypothèses pour expliquer ce résultat inattendu. Il est en effet établi que la méthode d'isolation des VE (kit commercial ou ultracentrifugation) ainsi que la durée de cette isolation (de 1 à 3 heures) peuvent modifier leur distribution en taille, leur concentration, la teneur en protéines du cargo et la pureté de la solution obtenue (184). Ces variations influencent directement la bioactivité des VE dans les tests *in vitro* et *in vivo*, justifiant la formule classique « The process is the product ». Il est donc envisageable que la méthode d'isolation des VE doive être adaptée en fonction de l'origine cellulaires des VE tout comme le stress appliqué aux cellules parentes pour induire la vésiculation. Par ailleurs, bien que plusieurs publications suggèrent que les VE dérivées de CSM sont aussi efficaces que les CSM pour préserver les tissus et favoriser la récupération fonctionnelle *in vivo*, ces résultats sont limités par l'absence de contrôles appropriés, et de standardisation des dosages, une évaluation insuffisante des divers critères de jugement, des variations dans la fréquence et le moment de l'administration, ainsi que par l'absence d'effets dose-dépendants. Ces limitations rendent donc encore difficile toute conclusion quant à une stricte équivalence de l'efficacité entre les VE et les CSM qui en sont à l'origine (185). L'application aux mdMSC et iMSC des techniques de préparation des VE, que nous avons précédemment développées au laboratoire pour isoler les VE de progéniteurs cardio-vasculaires, méconnaît peut-être certaines spécificités de ces types cellulaires, ce qui pourrait expliquer que dans les tests *in vitro* réalisés, elles ne se soient pas révélées bioactives.

3. Utilisation de la bio-impression 3D et choix du biomatériau

Dans les études précliniques, les CSM et les VE sont souvent administrées par injections, intramyocardiques (endo-ventriculaires ou trans-épicaudiques) ou intracoronaires. Toutefois, les limites de ces injections sont bien connues : mortalité cellulaire induite par la trypsinisation avec perte des attaches à une matrice et donc à des signaux nécessaires à la survie cellulaire

(anoïkose) et par les contraintes de cisaillement liées au passage des cellules à travers une aiguille de petit calibre ; répartition des cellules imprécise et donc difficilement reproductible ; création de foyers potentiellement arythmogènes ; et fuite mécanique, en particulier dans les conditions d'un cœur battant (186). Pour toutes ces raisons, l'utilisation d'un patch déposé sur l'épicaarde et soit ensemencé par les cellules (187–190) soit incorporant le secrétome cellulaire (102,191–195) s'est progressivement imposée comme une technique alternative efficace dès lors que l'on privilégie un mécanisme d'action essentiellement paracrine, fondé sur la diffusion vers le myocarde des facteurs libérés par les cellules ou directement par les VE. Le patch a ainsi l'avantage d'améliorer la survie et la rétention des cellules, de prolonger la diffusion des facteurs paracrines voire, en fonction de sa nature, de renforcer la paroi cardiaque.

L'utilisation de biomatériaux en complément des cellules apparaît donc comme une solution pour protéger les cellules en créant un micro-environnement favorable à leur survie (196) et/ou permettre la libération prolongée des VE sur la zone d'implantation (102). Cependant, la fabrication manuelle de ces constructions composites expose à un certain degré de variabilité en raison des multiples étapes de manipulation réalisées par l'opérateur, ce qui rend problématique un usage clinique. La fabrication automatisée du patch par bio-impression représente une alternative permettant de pallier ces limitations. C'est donc cette approche que nous avons privilégiée dans le cadre d'une collaboration avec la société Poietis.

Cette société a développé une plateforme de bio-impression de nouvelle génération (NGB). L'impression est automatisée et contrôlée par ordinateur ce qui permet de concevoir précisément l'architecture du biomatériau et l'environnement des cellules ou des VE dans des structures tridimensionnelles. De plus, la bio-imprimante intègre un système aéraulique qui assure un environnement de classe A permettant d'imprimer des biomatériaux dans des conditions stériles. Ce critère est indispensable pour répondre aux exigences réglementaires des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) requises pour des applications cliniques futures. Il est à noter que cette dernière notion est importante pour éviter l'écueil fréquent de travaux expérimentaux qui, même concluants, sont inapplicables en raison des conditions de fabrication du produit. Cette technologie garantit ainsi la reproductibilité des objets bio-imprimés et nous a permis de créer un hydrogel fonctionnalisé avec des mdMSC.

La technique de bio-impression employée repose sur l'extrusion pneumatique, qui permet d'utiliser une large gamme de biomatériaux et d'atteindre des densités cellulaires élevées. Par ailleurs, la taille et la résolution des filaments extrudés sont modulables en

ajustant divers paramètres tels que la vitesse d'extrusion, la température d'impression et la configuration de l'orifice de la buse. Il est toutefois important de souligner que cette méthode est généralement utilisée pour imprimer des encres à viscosité relativement élevée, ce qui accroît le risque d'obstruction des buses durant le processus d'impression. Un blocage partiel des buses peut ainsi générer une contrainte de cisaillement excessive, susceptible de modifier la morphologie des cellules et d'augmenter leur taux de mortalité (132).

Nous avons choisi d'utiliser le collagène comme bio-encre car Poietis avait déjà une grande expérience de la bio-impression de cet hydrogel et qu'il possède de nombreux avantages. C'est en effet, c'est un biomatériau biocompatible, biodégradable et qui favorise l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaires (132,197,198). Il est aussi facilement accessible, économique et conservable sur une longue durée. Il peut enfin être rendu de grade clinique et sa tolérance dans diverses applications thérapeutiques chez l'homme est bien établie. Le collagène remplit ainsi tous les critères indispensables à une utilisation clinique à grande échelle et économiquement soutenable. Parmi tous les types de collagène, le collagène de type I est le plus étudié dans la bio-impression 3D en raison de sa capacité à s'auto-assembler pour former des hydrogels fibreux à 37°C (111).

4. Effets thérapeutiques du patch cardiaque fonctionnalisé dans un modèle *in vivo*

La première étape de la partie *in vivo* de ce projet de thèse a été de maîtriser la mise en place du modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat. Nous avons opté pour un protocole d'ischémie-reperfusion, plutôt qu'une ligature permanente de l'artère coronaire (plus couramment employée) afin de mieux refléter la prise en charge clinique actuelle des patients victimes d'infarctus du myocarde, qui bénéficient dans la grande majorité des cas d'une revascularisation dans les heures suivant le début des signes cliniques (199). Les deux principales difficultés techniques qu'il a fallu surmonter ont été l'abord réintervention chirurgicale du cœur 1 mois après l'infarctus, rendue souvent compliquée par les adhérences, et l'obtention d'une adhérence suffisante du patch à la paroi cardiaque. L'entraînement a permis de régler le premier problème et l'utilisation du TachoSil, le second. Il s'agit d'un matériau utilisé en chirurgie à des fins hémostatiques. Il est constitué de fibrinogène et de thrombine humaine ; une fois appliqué contre la paroi cardiaque et au prix d'une légère pression avec une compresse humide, il a la particularité d'adhérer solidement. Nous avons

donc découpé des compresses de TachoSil d'une taille supérieure à celle des patches de collagène et en les positionnant à l'extérieur de ces derniers; la pression a alors permis aux patches bio-imprimés de coller à la paroi cardiaque au bout de quelques minutes du fait de l'adhérence pariétale du TachoSil dont une partie déborde les bords du patch.

Les principaux résultats ont été analysés par échocardiographie sur la plateforme d'imagerie de l'hôpital Cochin, en aveugle, avec une validation complémentaire par un cardiologue expérimenté (Pr A. Hagège). Ils font apparaître trois observations principales : (1) il existe une détérioration de la fonction cardiaque dans le groupe sham qui contraste avec les résultats obtenus dans les deux groupes traités, ce qui valide l'existence des infarctus et donc le modèle ; (2) dans le groupe traité par les patches acellulaires, la FEVG s'est stabilisée, témoignant d'une préservation de la fonction cardiaque par le seul collagène bio-imprimé. Cette amélioration, déjà rapportée dans la littérature (200), peut s'expliquer par la similitude du collagène avec la matrice extracellulaire (dont il est le constituant principal) et la création par le patch d'un microenvironnement propice à la survie et à la prolifération des cardiomyocytes situés en périphérie de la zone infarctée. Dans cette région de transition, les cardiomyocytes encore viables subissent une réorganisation majeure de leurs interactions avec les cellules voisines et la matrice extracellulaire. Le patch pourrait ainsi impacter favorablement les processus de remodelage tels que la dédifférenciation, la vacuolisation et l'hypertrophie des cardiomyocytes qui se poursuivent jusqu'à 3 mois après l'infarctus (201) ; (3) toutefois, l'ajout des mdMSC au collagène a un effet synergique ; ce groupe est en effet celui qui est associé à la meilleure récupération fonctionnelle, confirmant ainsi les résultats déjà publiés avec diverses combinaisons de types cellulaires et de bio-encres : cellules cardiaques progénitrices dans un mélange de gélatine et d'acide hyaluronique (202) ; cellules cardiaques progénitrices et CSM dans une matrice extra-cellulaire décellularisée (203,204) ; et même cardiomyocytes dérivés d'iPSC, cellules endothéliales et fibroblastes regroupées en cardiosphères bio-imprimés sans ajout d'un biomatériau (205). Le fait que cet effet cardio-protecteur du patch bio-imprimé ne se soit pas traduit par une réduction de la taille de l'infarctus n'est pas surprenant et une telle discordance n'est pas inhabituelle ; en effet, 1 mois après l'infarctus, la cicatrice fibreuse est fixée et l'amélioration procède principalement de la préservation du myocarde non infarcté induite par les effets paracrines des cellules greffées (206).

Cette hypothèse est ici en partie confirmée par les analyses transcriptomiques montrant que

les patches, avec ou sans mdMSC, ont principalement modulé l'expression de gènes associés à l'insuffisance cardiaque (*Nppb*), à l'apoptose (*Errfi1*), ainsi qu'à l'inflammation (*Cxcl11*, *Cxcl9*, *Ly6c*). Ces deux derniers phénomènes font partie des mécanismes délétères contribuant au remodelage cardiaque et décrits dans les phases chroniques de l'insuffisance cardiaque. En particulier, la diminution de marqueurs de la réponse inflammatoire est importante car une inflammation persistante joue un rôle pathogène dans l'insuffisance cardiaque chronique (207). De même, l'expression des gènes *Fn1*, *Col1a1*, *Col3a1* et *Plod2*, réduite chez les animaux traités, suggère un effet anti-fibrotique. En revanche, les gènes codant pour POSTN (périostine) et THBS1 (thrombospondine-1) sont fortement surexprimés par rapport au groupe sham. La périostine joue un rôle central dans la réparation myocardique post-infarctus. Chez les souris qui en sont déficientes, la cicatrisation est altérée, entraînant des ruptures cardiaques en raison d'une rigidité myocardique insuffisante (208). De façon similaire, la thrombospondine-1, exprimée dans la zone frontalière de l'infarctus, agit comme une barrière protectrice, limitant l'expansion du tissu de granulation et préservant le myocarde sain du remodelage fibrotique (209). Il semble donc bien exister un lien mécanistique entre ces modifications de l'expression des gènes et les effets fonctionnels positifs induits par la combinaison cellules+collagène réunis au sein d'un patch bio-imprimé.

5. Limitations

Cette thèse présente naturellement plusieurs limites.

La première tient au modèle animal utilisé qui, quel que soit le soin apporté à standardiser le site de l'occlusion coronaire temporaire, présente une variabilité importante susceptible d'affecter la reproductibilité des données et l'interprétation des résultats expérimentaux. Il existe également une variabilité individuelle dans la réponse au stress chirurgical et anesthésique. Nous avons tenté de limiter ces variations en incluant un nombre suffisant d'animaux, en homogénéisant au mieux les fonctions ventriculaires de base pour les rendre comparables et en complétant les analyses statistiques classiques par celle de la taille de l'effet.

Ensuite, la concentration cellulaire des patches bio-imprimés (environ 100.000 cellules/patch) est nettement inférieure à celle généralement rapportée dans la littérature, qui se situe entre 500.000 et 1 million par patch. Ce paramètre a été contraint par les

caractéristiques techniques de la bio-imprimante utilisée et par le programme d'impression pré-enregistré dans l'appareil. Il est donc possible que nous ayons sous-évalué le potentiel thérapeutique du patch qu'aurait pu optimiser une densité cellulaire plus élevée. Toutefois, une telle modification impliquerait de vérifier l'impact sur la viabilité cellulaire après extrusion, car une concentration plus élevée peut altérer ce paramètre. Par ailleurs, la concentration cellulaire n'a été évaluée qu'avant l'étape de bio-impression, c'est-à-dire avant l'extrusion des cellules dans le collagène. Il serait important à l'avenir de vérifier également la concentration réelle des cellules après impression pour la comparer à celle définie au préalable. Cette évaluation post-impression permettrait de mieux maîtriser la standardisation du produit et d'optimiser les conditions d'impression. Enfin, un raffinement des caractéristiques physico-chimiques du patch (élasticité, nano-topographie, distribution spatiale des cellules) est certainement souhaitable et justifie d'autant plus le recours à une technique flexible et modulable comme la bio-impression.

Enfin, si les mdMSC sont à l'origine de l'amélioration observée de la fonction cardiaque, les mécanismes exacts impliqués sont encore à élucider car notre analyse transcriptomique reste partielle. Un séquençage unicellulaire permettrait certainement de mieux comprendre les effets du patch fonctionnalisé sur les populations cellulaires du cœur et plus spécifiquement sur les différentes sous-populations (clusters) de fibroblastes dont on connaît l'hétérogénéité et le rôle clé dans le remodelage ventriculaire (210). En parallèle, une optimisation des procédés d'isolation des VE serait utile afin d'essayer d'en améliorer la bio-activité à un niveau équivalent à celui des cellules mères. Il n'est d'ailleurs pas impossible qu'une telle amélioration soit atteignable en adaptant la technique de préparation des VE aux spécificités des cellules mères, voire en renonçant à un fractionnement ciblant les seules VE au profit de l'utilisation du sécrétome dans son ensemble, c'est-à-dire incluant sa fraction protéique (211–214).

6. Les défis de la translation clinique des patches cardiaques bio-imprimés

La translation des projets de recherche sur les CSM vers des applications cliniques reste un défi principalement sur trois plans.

Sur le plan sécuritaire, l'utilisation, dans cette étude, de cellules autologues et d'un hydrogel éprouvé de longue date ne devrait pas poser de problèmes. On sait en effet que

l'implantation de biomatériaux peut induire une réaction à corps étranger susceptible de conduire à une fibrose et, par conséquent, à l'échec de l'implantation (215). C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser le collagène qui devrait prémunir d'un tel risque tandis que l'utilisation d'une source autologue élimine, à priori, les aléas d'une réponse immune. Le passage éventuel à des CSM musculaires allogéniques dans le but de constituer une banque poserait des problèmes différents et nécessiterait notamment de confirmer que la tolérance immune de ces cellules équivaut à celle désormais bien démontrée des CSM provenant des sources habituelles.

Sur le plan de l'efficacité, on sait que la reproductibilité des résultats obtenus en laboratoire, réalisés dans des conditions strictement contrôlées, peut être difficile à confirmer lors de la mise à l'échelle en vue d'une production conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). La valeur prédictive de ce modèle murin peut aussi être questionnée, notamment parce que les différences majeures de fréquence cardiaque entre le rat et l'homme ne permettent pas de mettre en évidence d'éventuelles arythmies ventriculaires. Les résultats obtenus dans cette thèse devront donc impérativement être confirmés dans une autre espèce et/ou un modèle différent en sachant les difficultés croissantes du recours à des gros animaux pour des raisons logistiques, économiques et réglementaires. L'utilisation, à des fins substitutives, de techniques *in vitro* (organoïdes, coupes fines de cœur humain) (216) reste une alternative potentiellement intéressante mais dont il reste à montrer qu'elle est pertinente pour évaluer ce type de biomatériaux cellularisés. Il faut enfin noter que la mise en place d'un patch nécessite un abord direct comme cela a été réalisé dans notre étude ; cela ne pose pas de problèmes si le patient doit être opéré pour une pathologie cardiaque, valvulaire ou coronaire, le dépôt du patch étant alors réalisé dans le même temps, sans risque supplémentaire associé. Il n'en va pas de même s'il n'y a pas d'indication opératoire. L'abord du cœur par une mini-thoracotomie aux seules fins d'implanter le patch est envisageable et pratiquée dans certains essais actuels ; il reste néanmoins un acte invasif qui n'est pas complètement dénué de risques, d'où les tentatives de développer des patches à mémoire de forme (217) « enroulés » autour d'un cathéter qui permet leur injection par voie endoscopique puis, une fois en place, leur déploiement sur le cœur (218). Si un tel dispositif a déjà été utilisé avec succès pour traiter la dégénérescence maculaire (patch porteur de progéniteurs rétiniens dérivés d'iPSC et injecté par voie intra-rétinienne) (219), son efficacité dans l'insuffisance cardiaque reste à démontrer.

Enfin, c'est sans doute sur le plan de la qualité du produit que se concentrent les principales difficultés « translationnelles ». Dans notre étude, toutes les étapes d'impression ont été réalisées à l'aide d'une bio-imprimante 3D de grade recherche, conçue pour être transposable à un usage clinique. Cette même technologie a permis le développement de Poieskin®, un substitut cutané dermo-épidermique autologue, bio-imprimé, destiné à la couverture permanente des pertes de substance cutanée. Par la suite, le même modèle de peau a été imprimé à l'aide d'une bio-imprimante de grade clinique (NGB-C™), aboutissant à la production d'un greffon de 40 cm² conforme aux standards réglementaires, et équivalent à une greffe autologue classique (220). Grâce à la précision de la NGB-C™ et à ses systèmes de contrôle intégrés, le procédé de fabrication est reproductible et compatible avec les exigences pharmaceutiques. Sur la base de ces résultats encourageants, un essai clinique de phase I/IIa a été envisagé. Toutefois, si la bio-impression peut ainsi permettre une automatisation de la production, il n'en est pas encore de même pour les mdMSC dont la technique de préparation actuelle n'est clairement pas adaptée à une expansion à grande échelle dans des conditions satisfaisant aux BPF et nécessiterait d'être modifiée dans ce sens, même si dans ce projet, les CSM dérivées de muscles ont été bien caractérisées dans le respect des directives de l'ISCT (221). Toutefois, d'autres aspects importants en pratique restent à étudier (conditions de stockage et de transport ; stabilité ; possibilité, à partir d'un stock de bio-encre et de cellules congelées, d'une production décentralisée permettant l'implantation d'un patch « frais »). Il faut ici rappeler que sur le plan réglementaire un patch cellularisé est classé en Médicament de Thérapie Innovante avec une exigence de contrôles-qualité portant non seulement sur les cellules (viabilité, identité, pureté, fonctionnalité, stérilité) et le biomatériau (notamment, toxicité de ses produits de dégradation) mais aussi sur leurs interactions.

Conclusion & Perspectives

1. Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était d'évaluer le potentiel thérapeutique de CSM de deux origines (muscle squelettique et lignée de cellules souches pluripotentes) et de leurs VE dans un modèle de dysfonction ventriculaire gauche ischémique tout en développant une approche innovante de transfert via un biomatériau bio-imprimé.

Les travaux menés ont permis de tirer plusieurs conclusions majeures :

1. L'origine des CSM influence fortement leur efficacité thérapeutique *in vitro*.
2. Les VE issues de ces deux sources cellulaires n'en reproduisent pas *in vitro* les effets protecteurs ;
3. *In vivo*, les mdMSC encapsulées dans un hydrogel de collagène bio-imprimé améliorent significativement la fonction cardiaque chez des rats atteints d'IC chronique post-infarctus. Le collagène seul permet de stabiliser cette fonction, confirmant les effets de ce biomatériau sur la préservation tissulaire.
4. L'amélioration fonctionnelle observée s'accompagne de modifications de l'expression de gènes clés impliqués dans le processus de remodelage cardiaque post-infarctus, suggérant une activation, par les patches et les cellules, de voies de signalisation contribuant à limiter les dommages myocardiques.

Ces résultats soulignent l'intérêt d'une source de CSM autologues facilement accessible et peu invasive pour le traitement de l'IC chronique. Associée à la bio-impression, cette stratégie permettrait de produire des patches thérapeutiques personnalisés, compatibles avec les exigences cliniques et les BPF.

2. Perspectives

Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives qui concernent d'abord l'utilisation des mdMSC, encore peu explorées dans le domaine des thérapies cellulaires. Il serait pertinent d'analyser plus en détail la composition de leur sécrétome (protéines solubles, cytokines, facteurs de croissance, ARN libres), afin d'identifier les molécules actives éventuellement responsables des effets observés que les seules VE ne semblent pas pouvoir expliquer, du

moins sur la base des tests *in vitro*.

Parallèlement, l'optimisation du protocole de bio-impression constitue un levier important pour améliorer l'efficacité thérapeutique. Nous avons déjà souligné l'intérêt d'ajuster les paramètres d'impression pour augmenter la densité cellulaire. Comme cela a été observé dans nos expériences *in vitro* avec le scratch test, une plus grande densité pourrait en effet renforcer les effets paracrines et amplifier la réponse tissulaire *in vivo*.

Au-delà de la concentration cellulaire, d'autres innovations technologiques pourraient être explorées. Plus particulièrement, l'utilisation de méthodes de bio-impression plus récentes, comme la bio-impression assistée par laser, permettrait un positionnement spatial précis des cellules au sein du patch. Cette technologie rend possible la création de gradients cellulaires ou de zones fonctionnalisées différenciées (par exemple avec ou sans cellules, avec des rapports variables), ce qui permettrait de mieux contrôler la libération du sécrétome et de s'adapter aux besoins spécifiques du tissu cible. Un tel contrôle spatial ouvre également la voie à des stratégies de modélisation « biomimétiques », visant à reproduire au mieux l'architecture du myocarde.

Enfin, il serait aussi utile de tester l'effet thérapeutique des mdMSC seules, administrées sans support d'un biomatériau par des injections intramyocardiques. Ces expériences permettraient de confirmer la contribution propre du biomatériau en tant que support protecteur et structurant, agissant non seulement comme vecteur des cellules, mais aussi comme niche tridimensionnelle temporaire favorisant leur survie, rétention et activité paracrine.

Références

1. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol*. 15 déc 2015;6(1):187-214.
2. Snipelisky D, Chaudhry SP, Stewart GC. The Many Faces of Heart Failure. *Card Electrophysiol Clin*. mars 2019;11(1):11-20.
3. Agrinier N. Insuffisance cardiaque: épidémiologie, caractéristiques des patients et de leur prise en charge, et facteurs pronostiques de décès. Université de Lorraine; 2018.
4. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 3 mai 2022;145(18):e895-1032.
5. Delahaye F. Recommandations de l'American College of Cardiology – American Heart Association sur l'insuffisance cardiaque. *Réal Cardiol* [Internet]. 17 oct 2013 [cité 28 févr 2025]; Disponible sur: <https://www.realites-cardiologiques.com/2013/10/17/recommandations-de-lamerican-college-of-cardiology-american-heart-association-sur-linsuffisance-cardiaque/>
6. Organisation Mondiale de la Santé. Organisation Mondiale de la Santé. 2020 [cité 4 avr 2021]. Les 10 principales causes de mortalité. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
7. Organisation Mondiale de la Santé. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2021 [cité 28 févr 2025]. Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
8. Inserm [Internet]. 2019 [cité 17 mars 2023]. Infarctus du myocarde · Inserm, La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/infarctus-myocarde/>
9. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2020;22(8):1342-56.
10. Santé Publique France. Santé Publique France. 2019 [cité 4 avr 2021]. Prévalences et statut fonctionnel des cardiopathies ischémiques et de l'insuffisance cardiaque dans la population adulte en France : apports des enquêtes déclaratives « Handicap-Santé ». Disponible sur: [/maladies-et-traumatismes/maladies-cardiovasculaires-et-accident-vasculaire-cerebral/insuffisance-cardiaque/prevalences-et-statut-fonctionnel-des-cardiopathies-ischemiques-et-de-l-insuffisance-cardiaque-dans-la-population-adulte-en-france-apports-des-en](#)
11. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J*. 14 juill 2022;43(27):2549-61.
12. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DPV. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2012;94(2):276-83.

13. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;1841-75.
14. Frangogiannis NG. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *J Clin Invest*. 127(5):1600-12.
15. González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, López-Olañeta MM, Sandoval P, Snabel J, et al. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*. 1 janv 2016;109(1):67-78.
16. Frangogiannis NG, Kovacic JC. Extracellular Matrix in Ischemic Heart Disease, Part 4/4: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 5 mai 2020;75(17):2219-35.
17. Shannon AW, Harrigan RA. General pharmacologic treatment of acute myocardial infarction. *Emerg Med Clin North Am*. 1 mai 2001;19(2):417-31.
18. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 1 mars 2018;6(3):179-86.
19. Garbern JC, Lee RT. Heart regeneration: 20 years of progress and renewed optimism. *Dev Cell*. 28 févr 2022;57(4):424-39.
20. Müller P, Lemcke H, David R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol Biochem*. 28 août 2018;48(6):2607-55.
21. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 4 mars 2008;117(9):1189-200.
22. Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration — lessons learned and future directions. *Nat Rev Cardiol*. nov 2018;15(11):659-71.
23. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. Myocardial regeneration after intracoronary transplantation of human autologous stem cells following acute myocardial infarction. *DMW - Dtsch Med Wochenschr*. 12 mai 2004;126:932-8.
24. Vithani V, Sutariya B, Montenegro DM, Chukwu M, Ehsan P, Aburumman RN, et al. A Systematic Review of CD34+ Stem Cell Therapy as an Innovative and Efficient Treatment for the Management of Refractory Angina. *Cureus*. 18 déc 2022;14(12):e32665.
25. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Lee JS, Costa MA, Bass T, et al. Intramyocardial, Autologous CD34+ Cell Therapy for Refractory Angina. *Circ Res*. 7 juill 2011;109(4):428.
26. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*. 2013;2013:496218.
27. Oskowitz A, McFerrin H, Gutschow M, Carter ML, Pochampally R. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Res*. 1 mai 2011;6(3):215-25.

28. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. In: Atala A, Lanza R, Mikos AG, Nerem R, éditeurs. *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2019 [cité 22 oct 2021]. p. 219-27. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098806000151>
29. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SCJ, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*. mai 2014;509(7500):337-41.
30. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet*. 10 mars 2012;379(9819):895-904.
31. Bartunek J, Davison B, Sherman W, Povsic T, Henry TD, Gersh B, et al. Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) trial design. *Eur J Heart Fail*. févr 2016;18(2):160-8.
32. Bartunek J, Terzic A, Davison BA, Filippatos GS, Radovanovic S, Beleslin B, et al. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischaemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *Eur Heart J*. 1 mars 2017;38(9):648-60.
33. Yu H, Lu K, Zhu J, Wang J. Stem cell therapy for ischemic heart diseases. *Br Med Bull*. 1 janv 2017;121(1):135-54.
34. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol*. août 2018;36(7):597-605.
35. Chong JJH, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 12 juin 2014;510(7504):273-7.
36. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. sept 2007;25(9):1015-24.
37. Menasché P, Vanneaux V, Haggège A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 30 janv 2018;71(4):429-38.
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 25 août 2006;126(4):663-76.
39. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 30 nov 2007;131(5):861-72.
40. Kuzmenkin A, Liang H, Xu G, Pfannkuche K, Eichhorn H, Fatima A, et al. Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro. *FASEB J*. 2009;23(12):4168-80.

41. Burridge PW, Zambidis ET. Highly Efficient Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Cardiomyocytes. In: *Pluripotent Stem Cells* [Internet]. Humana Press, Totowa, NJ; 2013 [cité 6 mars 2025]. p. 149-61. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-348-0_12
42. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res*. 27 févr 2009;104(4):e30-41.
43. Zhang L, Guo J, Zhang P, Xiong Q, Wu SC, Xia L, et al. Derivation and high engraftment of patient-specific cardiomyocyte sheet using induced pluripotent stem cells generated from adult cardiac fibroblast. *Circ Heart Fail*. janv 2015;8(1):156-66.
44. Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang P, Zhang L, Somasundaram P, et al. Cardiac Repair in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction with Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Cells. *Cell Stem Cell*. 4 déc 2014;15(6):750-61.
45. Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 1 févr 2017;13(1):7-16.
46. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
47. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31.
48. Gopalarethinam J, Nair AP, Iyer M, Vellingiri B, Subramaniam MD. Advantages of mesenchymal stem cell over the other stem cells. *Acta Histochem*. mai 2023;125(4):152041.
49. Wu X, Jiang J, Gu Z, Zhang J, Chen Y, Liu X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther*. 8 août 2020;11(1):345.
50. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 2 avr 1999;284(5411):143-7.
51. Leibacher J, Henschler R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 11 janv 2016;7:7.
52. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 9 mars 2018;9(1):63.
53. Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2020;53(1):e12712.
54. Sirpilla O, and Kenderian SS. Bioengineering MSCs for untapped therapeutic potential. *Immunotherapy*. 21 août 2024;16(14-15):907-11.
55. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep

reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. 1 juill 1983;33(3):967-78.

56. Csöbönyeiová M, Beerová N, Klein M, Debreová-Čeháková M, Danišovič L. Cell-Based and Selected Cell-Free Therapies for Myocardial Infarction: How Do They Compare to the Current Treatment Options? *Int J Mol Sci*. janv 2022;23(18):10314.
57. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*. 1 mai 2015;23(5):812-23.
58. Jeppesen DK, Zhang Q, Franklin JL, Coffey RJ. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends Cell Biol*. 1 août 2023;33(8):667-81.
59. Salomon C, Das S, Erdbrügger U, Kalluri R, Kiang Lim S, Olefsky JM, et al. Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*. 1 juin 2022;43(3):441-68.
60. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
61. Hu Y, Yang R, Liu S, Song Z, Wang H. The Emerging Roles of Nanocarrier Drug Delivery System in Treatment of Intervertebral Disc Degeneration-Current Knowledge, Hot Spots, Challenges and Future Perspectives. *Drug Des Devel Ther*. 29 mars 2024;18:1007-22.
62. Kang T, Atukorala I, Mathivanan S. Biogenesis of Extracellular Vesicles. *Subcell Biochem*. 2021;97:19-43.
63. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 1 avr 2016;36(3):301-12.
64. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 15 févr 2019;9(1):19.
65. Fang F, Yang J, Wang J, Li T, Wang E, Zhang D, et al. The role and applications of extracellular vesicles in osteoporosis. *Bone Res*. 23 janv 2024;12(1):1-16.
66. Gioseffi A, Edelmann MJ, Kima PE. Intravacuolar Pathogens Hijack Host Extracellular Vesicle Biogenesis to Secrete Virulence Factors. *Front Immunol*. 20 avr 2021;12:662944.
67. Clancy JW, Schmidtman M, D'Souza-Schorey C. The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances*. 4 mars 2021;3(6):399-406.
68. Oggero S, Austin-Williams S, Norling LV. The Contrasting Role of Extracellular Vesicles in Vascular Inflammation and Tissue Repair. *Front Pharmacol* [Internet]. 17 déc 2019 [cité 11 mars 2025];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2019.01479/full>
69. Wang Q, Yu J, Kadungure T, Beyene J, Zhang H, Lu Q. ARMMs as a versatile platform for intracellular delivery of macromolecules. *Nat Commun*. 6 mars 2018;9(1):960.

70. Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci*. 13 mars 2012;109(11):4146-51.
71. Zhou M, Li YJ, Tang YC, Hao XY, Xu WJ, Xiang DX, et al. Apoptotic bodies for advanced drug delivery and therapy. *J Controlled Release*. 1 nov 2022;351:394-406.
72. Han D, Li Z, Wang F, Cheng K, Shen D. Apoptotic extracellular vesicles: mechanisms, applications, and therapeutic potential. *Med-X*. 16 déc 2024;2(1):27.
73. Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res*. janv 2015;25(1):24-38.
74. Jiao H, Yu L. Migrasomes: Biogenesis, physiological roles, and therapeutic potentials. *J Cell Biol*. 14 oct 2024;223(11):e202403051.
75. Yu S, Yu L. Migrasome biogenesis and functions. *FEBS J*. 2022;289(22):7246-54.
76. Di Daniele A, Antonucci Y, Campello S. Migrasomes, new vescicles as Hansel and Gretel white pebbles? *Biol Direct*. 28 avr 2022;17(1):8.
77. Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 1 avr 2015;40:41-51.
78. Ciardiello C, Migliorino R, Leone A, Budillon A. Large extracellular vesicles: Size matters in tumor progression. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1 févr 2020;51:69-74.
79. Ozkocak DC, Phan TK, Poon IKH. Translating extracellular vesicle packaging into therapeutic applications. *Front Immunol* [Internet]. 15 août 2022 [cité 12 mars 2025];13. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.946422/full>
80. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 22 févr 2016;428(4):688-92.
81. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
82. Kim DK, Lee J, Simpson RJ, Lötvall J, Ghossein YS. EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research. *Semin Cell Dev Biol*. avr 2015;40:4-7.
83. Shahraki K, Boroumand PG, Lotfi H, Radnia F, Shahriari H, Sargazi S, et al. An update in the applications of exosomes in cancer theranostics: from research to clinical trials. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1 août 2023;149(10):8087-116.
84. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of

exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* janv 2019;21(1):9-17.

85. Li J, Salvador AM, Li G, Valkov N, Ziegler O, Yeri A, et al. Mir-30d Regulates Cardiac Remodeling by Intracellular and Paracrine Signaling. *Circ Res.* 8 janv 2021;128(1):e1-23.
86. Teng X, Chen L, Chen W, Yang J, Yang Z, Shen Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cell Physiol Biochem.* 9 déc 2015;37(6):2415-24.
87. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1 sept 2014;103(4):530-41.
88. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* mai 2010;4(3):214-22.
89. Yu B, Kim HW, Gong M, Wang J, Millard RW, Wang Y, et al. Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol.* 1 mars 2015;182:349-60.
90. Li Q, Xu Y, Lv K, Wang Y, Zhong Z, Xiao C, et al. Small extracellular vesicles containing miR-486-5p promote angiogenesis after myocardial infarction in mice and nonhuman primates. *Sci Transl Med.* 10 mars 2021;13(584):eabb0202.
91. Zhu X, Badawi M, Pomeroy S, Sutaria DS, Xie Z, Baek A, et al. Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells. *J Extracell Vesicles.* 2017;6(1):1324730.
92. Xia Y, Zhang J, Liu G, Wolfram J. Immunogenicity of Extracellular Vesicles. *Adv Mater.* 2024;36(33):2403199.
93. Tan F, Li X, Wang Z, Li J, Shahzad K, Zheng J. Clinical applications of stem cell-derived exosomes. *Signal Transduct Target Ther.* 12 janv 2024;9(1):1-31.
94. Munir J, Yoon JK, Ryu S. Therapeutic miRNA-Enriched Extracellular Vesicles: Current Approaches and Future Prospects. *Cells.* oct 2020;9(10):2271.
95. Yang C, Xue Y, Duan Y, Mao C, Wan M. Extracellular vesicles and their engineering strategies, delivery systems, and biomedical applications. *J Controlled Release.* 1 janv 2024;365:1089-123.
96. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 15 juill 2019;8(7):727.
97. Kawasumi R, Kawamura T, Yamashita K, Tominaga Y, Harada A, Ito E, et al. Systemic administration of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells improves cardiac function through extracellular vesicle-mediated tissue repair in a rat model of ischemic cardiomyopathy. *Regen Ther.* mars 2025;28:253-61.

98. Yan W, Xia Y, Zhao H, Xu X, Ma X, Tao L. Stem cell-based therapy in cardiac repair after myocardial infarction: Promise, challenges, and future directions. *J Mol Cell Cardiol.* 1 mars 2024;188:1-14.
99. Mozid A, Yeo C, Arnous S, Ako E, Saunders N, Locca D, et al. Safety and feasibility of intramyocardial versus intracoronary delivery of autologous cell therapy in advanced heart failure: the REGENERATE-IHD pilot study. *Regen Med.* mai 2014;9(3):269-78.
100. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation.* 1 mai 2007;115(17):2254-61.
101. Sim DS, Jones DA, Davies C, Locca D, Veerapen J, Reid A, et al. Cell Administration Routes for Heart Failure: A Comparative Re-evaluation of the REGENERATE-DCM and REGENERATE-IHD Trials. *Regen Med.* 1 déc 2022;17(12):891-903.
102. Pezzana C, Cras A, Simelière F, Guesdon R, Desgres M, Correa BL, et al. Biomaterial-embedded extracellular vesicles improve recovery of the dysfunctional myocardium. *Biomaterials.* déc 2022;291:121877.
103. Aguado BA, Mulyasasmita W, Su J, Lampe KJ, Heilshorn SC. Improving Viability of Stem Cells During Syringe Needle Flow Through the Design of Hydrogel Cell Carriers. *Tissue Eng Part A.* avr 2012;18(7-8):806-15.
104. He S, Zhang Z, Luo R, Jiang Q, Yang L, Wang Y. Advances in Injectable Hydrogel Strategies for Heart Failure Treatment. *Adv Healthc Mater.* 2023;12(19):2300029.
105. Duan B. Concise review: Harnessing iPSC-derived cells for ischemic heart disease treatment. *J Transl Intern Med.* 1 mars 2020;8(1):20-5.
106. Hoeeg C, Dolatshahi-Pirouz A, Follin B. Injectable Hydrogels for Improving Cardiac Cell Therapy—In Vivo Evidence and Translational Challenges. *Gels.* mars 2021;7(1):7.
107. Wu K, Wang Y, Yang H, Chen Y, Lu K, Wu Y, et al. Injectable Decellularized Extracellular Matrix Hydrogel Containing Stromal Cell-Derived Factor 1 Promotes Transplanted Cardiomyocyte Engraftment and Functional Regeneration after Myocardial Infarction. *ACS Appl Mater Interfaces.* 18 janv 2023;15(2):2578-89.
108. Chen Y, Li C, Li C, Chen J, Li Y, Xie H, et al. Tailorable Hydrogel Improves Retention and Cardioprotection of Intramyocardial Transplanted Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Myocardial Infarction in Mice. *J Am Heart Assoc.* 21 janv 2020;9(2):e013784.
109. Chang T, Liu C, Yang H, Lu K, Han Y, Zheng Y, et al. Fibrin-based cardiac patch containing neuregulin-1 for heart repair after myocardial infarction. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 déc 2022;220:112936.
110. Huang K, Ozpinar EW, Su T, Tang J, Shen D, Qiao L, et al. An off-the-shelf artificial cardiac patch improves cardiac repair after myocardial infarction in rats and pigs. *Sci Transl Med.* 8 avr 2020;12(538):eaat9683.

111. Unagolla JM, Jayasuriya AC. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl Mater Today*. 1 mars 2020;18:100479.
112. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D Bioprinting for Engineering Complex Tissues. *Biotechnol Adv*. 2016;34(4):422-34.
113. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*. août 2014;32(8):773-85.
114. Li X, Liu B, Pei B, Chen J, Zhou D, Peng J, et al. Inkjet Bioprinting of Biomaterials. *Chem Rev*. 14 oct 2020;120(19):10793-833.
115. Pu X, Wu Y, Liu J, Wu B. 3D Bioprinting of Microbial-based Living Materials for Advanced Energy and Environmental Applications. *Chem Bio Eng*. 22 août 2024;1(7):568-92.
116. Diamantides N, Dugopolski C, Blahut E, Kennedy S, Bonassar LJ. High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks. *Biofabrication*. 22 août 2019;11(4):045016.
117. Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*. 1 janv 2016;76:321-43.
118. Gu Z, Fu J, Lin H, He Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian J Pharm Sci*. 1 sept 2020;15(5):529-57.
119. Nair K, Gandhi M, Khalil S, Yan KC, Marcolongo M, Barbee K, et al. Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnol J*. 2009;4(8):1168-77.
120. Guillemot F, Souquet ,Agnès, Catros ,Sylvain, and Guillotin B. Laser-Assisted Cell Printing: Principle, Physical Parameters Versus Cell Fate and Perspectives in Tissue Engineering. *Nanomed*. 1 avr 2010;5(3):507-15.
121. Hakobyan D, Kerouredan O, Remy M, Dusserre N, Medina C, Devillard R, et al. Laser-Assisted Bioprinting for Bone Repair. In: 3D Bioprinting [Internet]. Humana, New York, NY; 2020 [cité 18 mars 2025]. p. 135-44. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0520-2_8
122. Yang H, Yang KH, Narayan RJ, Ma S. Laser-based bioprinting for multilayer cell patterning in tissue engineering and cancer research. *Essays Biochem*. 6 août 2021;65(3):409-16.
123. Xu HQ, Liu JC, Zhang ZY, Xu CX. A review on cell damage, viability, and functionality during 3D bioprinting. *Mil Med Res*. déc 2022;9(1):1-15.
124. Bernal PN, Delrot P, Loterie D, Li Y, Malda J, Moser C, et al. Volumetric Bioprinting of Complex Living-Tissue Constructs within Seconds. *Adv Mater*. 2019;31(42):1904209.
125. Wu CA, Zhu Y, Woo YJ. Advances in 3D Bioprinting: Techniques, Applications, and Future Directions for Cardiac Tissue Engineering. *Bioengineering*. juill 2023;10(7):842.
126. Rider P, Kačarević ŽP, Alkildani S, Retnasingh S, Barbeck M. Bioprinting of tissue

engineering scaffolds. *J Tissue Eng.* 1 janv 2018;9:2041731418802090.

127. Kumar H, Kim K. Stereolithography 3D Bioprinting. In: 3D Bioprinting [Internet]. Humana, New York, NY; 2020 [cité 18 mars 2025]. p. 93-108. Disponible sur: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0520-2_6
128. O'Connell CD, Zhang B, Onofrillo C, Duchi S, Blanchard R, Quigley A, et al. Tailoring the mechanical properties of gelatin methacryloyl hydrogels through manipulation of the photocrosslinking conditions. *Soft Matter.* 14 mars 2018;14(11):2142-51.
129. Zhou D, Chen J, Liu B, Zhang X, Li X, Xu T. Bioinks for jet-based bioprinting. *Bioprinting.* 1 déc 2019;16:e00060.
130. Agarwal T, Fortunato GM, Hann SY, Ayan B, Vajanthri KY, Presutti D, et al. Recent Advances in Bioprinting Technologies for Engineering Cardiac Tissue. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* mai 2021;124:112057.
131. Derakhshanfar S, Mbeleck R, Xu K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact Mater.* 1 juin 2018;3(2):144-56.
132. Zhang X, Zhao G, Ma T, Simmons CA, Santerre JP. A critical review on advances and challenges of bioprinted cardiac patches. *Acta Biomater* [Internet]. 5 oct 2024 [cité 13 nov 2024]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270612400583X>
133. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 1 janv 2012;37(1):106-26.
134. Alonzo M, AnilKumar S, Roman B, Tasnim N, Joddar B. 3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy. *Transl Res.* 1 sept 2019;211:64-83.
135. Roche CD, Lin H, Huang Y, de Bock CE, Beck D, Xue M, et al. 3D bioprinted alginate-gelatin hydrogel patches containing cardiac spheroids recover heart function in a mouse model of myocardial infarction. *Bioprinting.* 1 avr 2023;30:e00263.
136. Esser TU, Anspach A, Muenzebrock KA, Kah D, Schrüfer S, Schenk J, et al. Direct 3D-Bioprinting of hiPSC-Derived Cardiomyocytes to Generate Functional Cardiac Tissues. *Adv Mater.* 2023;35(52):2305911.
137. Osidak EO, Kozhukhov VI, Osidak MS, Domogatsky SP. Collagen as Bioink for Bioprinting: A Comprehensive Review. *Int J Bioprinting.* 21 avr 2020;6(3):270.
138. Roacho-Pérez JA, Garza-Treviño EN, Moncada-Saucedo NK, Carriquiry-Chequer PA, Valencia-Gómez LE, Matthews ER, et al. Artificial Scaffolds in Cardiac Tissue Engineering. *Life.* 25 juill 2022;12(8):1117.
139. Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN. Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. *Tissue Eng Part B Rev.* 1 déc 2014;20(6):683-96.

140. Wang Y, Fan Z, Li Q, Lu J, Wang X, Zhang J, et al. Construction of a myocardial patch with mesenchymal stem cells and poly(CL-co-TOSUO)/collagen scaffolds for myocardial infarction repair by coaxial electrospinning. *J Mater Chem B*. 7 juin 2023;11(22):4980-90.
141. Wang H, Guo Y, Hu Y, Zhou Y, Chen Y, Huang X, et al. Ultrasound-controlled nano oxygen carriers enhancing cell viability in 3D GelMA hydrogel for the treatment of myocardial infarction. *Int J Biol Macromol*. 31 juill 2023;244:125139.
142. Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. Fibrin, the preferred scaffold for cell transplantation after myocardial infarction? An old molecule with a new life. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(8):2304-13.
143. Budharaju H, Sundaramurthi D, Sethuraman S. Efficient dual crosslinking of protein-in-polysaccharide bioink for biofabrication of cardiac tissue constructs. *Biomater Adv*. 1 sept 2023;152:213486.
144. Deshpande MV, Girase A, King MW. Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) Resorbable Multifilament Yarn under Physiological Conditions. *Polymers*. janv 2023;15(18):3819.
145. Abodunrin OD, Bricha M, El Mabrouk K. Developments in 3D-Printed Polymeric Materials and Bioactive Materials Integration for Biomedical Applications. In: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* [Internet]. Elsevier; 2024 [cité 21 mars 2025]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323954860000284>
146. Wang Z, Lee SJ, Cheng HJ, Yoo JJ, Atala A. 3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs. *Acta Biomater*. 1 avr 2018;70:48-56.
147. Zhu Y, Guo S, Ravichandran D, Ramanathan A, Sobczak MT, Sacco AF, et al. 3D-Printed Polymeric Biomaterials for Health Applications. *Adv Healthc Mater*. 2025;14(1):2402571.
148. Wang Y, Cui H, Wang Y, Xu C, Esworthy TJ, Hann SY, et al. 4D Printed Cardiac Construct with Aligned Myofibers and Adjustable Curvature for Myocardial Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 24 mars 2021;13(11):12746-58.
149. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 1 sept 2011;3(3):1377-97.
150. Guvendiren M, Molde J, Soares RMD, Kohn J. Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomater Sci Eng*. 10 oct 2016;2(10):1679-93.
151. Zhang J, Li J, Qu X, Liu Y, Sun L, Harada A, et al. Development of composite functional tissue sheets using hiPSC-CMs and hADSCs to improve the cardiac function after myocardial infarction. *Bioact Mater*. 25 avr 2024;37:533-48.
152. Tripathi S, Mandal SS, Bauri S, Maiti P. 3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications. *MedComm*. 24 déc 2022;4(1):e194.
153. Theus AS, Ning L, Hwang B, Gil C, Chen S, Wombwell A, et al. Bioprintability: Physiomechanical and Biological Requirements of Materials for 3D Bioprinting Processes. *Polymers*. 1 oct 2020;12(10):2262.

154. Kim J. Characterization of Biocompatibility of Functional Bioinks for 3D Bioprinting. *Bioengineering*. 9 avr 2023;10(4):457.
155. Bedell ML, Melchiorri AJ, Aleman J, Skardal A, Mikos AG. A high-throughput approach to compare the biocompatibility of candidate bioink formulations. *Bioprinting*. 1 mars 2020;17:e00068.
156. Prestwich GD. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *J Controlled Release*. 30 oct 2011;155(2):193-9.
157. Organisation internationale de normalisation. ISO. [cité 26 mars 2025]. ISO/FDIS 10993-1 - Évaluation biologique des dispositifs médicaux. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/standard/84512.html>
158. O'Connell CD, Onofrillo C, Duchi S, Li X, Zhang Y, Tian P, et al. Evaluation of sterilisation methods for bio-ink components: gelatin, gelatin methacryloyl, hyaluronic acid and hyaluronic acid methacryloyl. *Biofabrication*. 3 avr 2019;11(3):035003.
159. Mladenovska T, Choong ,Peter F, Wallace ,Gordon G, and O'Connell CD. The Regulatory Challenge of 3D Bioprinting. *Regen Med*. 1 août 2023;18(8):659-74.
160. Nicotra T, Desnos A, Halimi J, Antonot H, Reppel L, Belmas T, et al. Mesenchymal stem/stromal cell quality control: validation of mixed lymphocyte reaction assay using flow cytometry according to ICH Q2(R1). *Stem Cell Res Ther*. 1 oct 2020;11(1):426.
161. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. mai 2010;27(5):796-810.
162. Palano G, Jansson M, Backmark A, Martinsson S, Sabirsh A, Hultenby K, et al. A high-content, in vitro cardiac fibrosis assay for high-throughput, phenotypic identification of compounds with anti-fibrotic activity. *J Mol Cell Cardiol*. mai 2020;142:105-17.
163. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 1 janv 2006;8(4):315-7.
164. Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: Expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev*. 1 sept 2010;20:915-23.
165. Witt E, Hammer E, Dörr M, Weitmann K, Beug D, Lehnert K, et al. Correlation of gene expression and clinical parameters identifies a set of genes reflecting LV systolic dysfunction and morphological alterations. *Physiol Genomics*. août 2019;51(8):356-67.
166. Altara R, Gu YM, Struijker-Boudier HAJ, Thijs L, Staessen JA, Blankesteyn WM. Left Ventricular Dysfunction and CXCR3 Ligands in Hypertension: From Animal Experiments to a Population-Based Pilot Study. *PLOS ONE*. 27 oct 2015;10(10):e0141394.
167. Altara R, Manca M, Hessel MH, Gu Y, van Vark LC, Akkerhuis KM, et al. CXCL10 Is a Circulating Inflammatory Marker in Patients with Advanced Heart Failure: a Pilot Study. *J*

168. Lu W, Allickson J. Mesenchymal stromal cell therapy: Progress to date and future outlook. *Mol Ther* [Internet]. 6 févr 2025 [cité 16 avr 2025]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001625000930>
169. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev Rep*. juin 2022;18(5):1525-45.
170. Fusco C, De Rosa G, Spatocco I, Vitiello E, Procaccini C, Frigè C, et al. Extracellular vesicles as human therapeutics: A scoping review of the literature. *J Extracell Vesicles*. mai 2024;13(5):e12433.
171. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. Treatment of Non-ischemic Dilated Cardiomyopathies by Intravenous Infusions of the Extracellular Vesicle-Enriched Secretome of Cardiovascular Progenitor Cells [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2023 sept [cité 16 avr 2025]. Report No.: NCT05774509. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05774509>
172. Guo Y, Yu Y, Hu S, Chen Y, Shen Z. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis*. 11 mai 2020;11(5):349.
173. Margiana R, Markov A, Zekiy AO, Hamza MU, Al-Dabbagh KA, Al-Zubaidi SH, et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Res Ther*. 28 juill 2022;13(1):366.
174. Kishore R, Khan M. Stem Cell Exosomes as Cell-Free Modality for Cardiac Repair. *Circ Res*. 22 janv 2016;118(2):330-43.
175. Muthu S, Bapat A, Jain R, Jeyaraman N, Jeyaraman M. Exosomal therapy—a new frontier in regenerative medicine. *Stem Cell Investig*. 2 avr 2021;8:7.
176. Krishna Mohan GV, Tirumandyam G, Vemulapalli HS, Vajje J, Asif H, Saleem F. Mesenchymal Stem Cell Therapy for a Better Prognosis of Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cureus*. août 2023;15(8):e43037.
177. Thompson M, Mei SHJ, Wolfe D, Champagne J, Fergusson D, Stewart DJ, et al. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. févr 2020;19:100249.
178. Van Delen M, Derdelinckx J, Wouters K, Nelissen I, Cools N. A systematic review and meta-analysis of clinical trials assessing safety and efficacy of human extracellular vesicle-based therapy. *J Extracell Vesicles*. juill 2024;13(7):e12458.
179. Ceusters J, Lejeune JPh, Sandersen C, Niesten A, Lagneaux L, Serteyn D. From skeletal muscle to stem cells: an innovative and minimally-invasive process for multiple species. *Sci Rep*. 6 avr 2017;7:696.
180. Serteyn D, Ceusters J. New Uses Of Mammalian Muscle-Derived Stem Cells [Internet]. US20210116441A1, 2021 [cité 14 avr 2025]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US20210116441A1/fr>

181. Bloor AJC, Patel A, Griffin JE, Gilleece MH, Radia R, Yeung DT, et al. Production, safety and efficacy of iPSC-derived mesenchymal stromal cells in acute steroid-resistant graft versus host disease: a phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study. *Nat Med.* nov 2020;26(11):1720-5.
182. Choudhery MS, Mahmood R, Harris DT, Ahmad FJ. Minimum criteria for defining induced mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* juin 2022;46(6):986-9.
183. Vaka R, Davis DR. State-of-play for cellular therapies in cardiac repair and regeneration. *Stem Cells.* déc 2021;39(12):1579-88.
184. Zhao AG, Shah K, Cromer B, Sumer H. Comparative analysis of extracellular vesicles isolated from human mesenchymal stem cells by different isolation methods and visualisation of their uptake. *Exp Cell Res.* 15 mai 2022;414(2):113097.
185. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 1 avr 2017;35(4):851-8.
186. van den Akker F, Feyen DAM, van den Hoogen P, van Laake LW, van Eeuwijk ECM, Hoefer I, et al. Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow. *Eur Heart J.* 14 janv 2017;38(3):184-6.
187. Jin J, Jeong SI, Shin YM, Lim KS, Shin H soo, Lee YM, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co-ε-caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(2):147-53.
188. Narita T, Shintani Y, Ikebe C, Kaneko M, Campbell NG, Coppen SR, et al. The Use of Scaffold-free Cell Sheet Technique to Refine Mesenchymal Stromal Cell-based Therapy for Heart Failure. *Mol Ther.* 1 avr 2013;21(4):860-7.
189. Yanamandala M, Zhu W, Garry DJ, Kamp TJ, Hare JM, Jun H wook, et al. Overcoming the Roadblocks to Cardiac Cell Therapy Using Tissue Engineering. *J Am Coll Cardiol.* 8 août 2017;70(6):766-75.
190. Jiang Z, Chen L, Huang L, Yu S, Lin J, Li M, et al. Bioactive Materials That Promote the Homing of Endogenous Mesenchymal Stem Cells to Improve Wound Healing. *Int J Nanomedicine.* 2024;19:7751-73.
191. Waters R, Alam P, Pacelli S, Chakravarti AR, Ahmed RPH, Paul A. Stem cell-inspired secretome-rich injectable hydrogel to repair injured cardiac tissue. *Acta Biomater.* 15 mars 2018;69:95-106.
192. Chen CW, Wang LL, Zaman S, Gordon J, Arisi MF, Venkataraman CM, et al. Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1 juin 2018;114(7):1029-40.
193. Lv K, Li Q, Zhang L, Wang Y, Zhong Z, Zhao J, et al. Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction. *Theranostics.* 2019;9(24):7403-16.

194. Han C, Zhou J, Liang C, Liu B, Pan X, Zhang Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair. *Biomater Sci.* 25 juin 2019;7(7):2920-33.
195. Pezzana C, Agnely F, Bochot A, Siepmann J, Menasché P. Extracellular Vesicles and Biomaterial Design: New Therapies for Cardiac Repair. *Trends Mol Med.* mars 2021;27(3):231-47.
196. Vilquin JT, Etienne J. Thérapies cellulaires des cardiopathies : Évolution du paradigme. *Med Sci MS.* nov 2016;32 Hors série n°2:30-9.
197. Muthukumar T, Sreekumar G, Sastry TP, Chamundeeswari M. Collagen as a Potential Biomaterial in Biomedical Applications. *Rev Adv Mater Sci.* 1 janv 2018;53(1):29-39.
198. Khan R, Khan MH. Use of collagen as a biomaterial: An update. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(4):539-42.
199. Pezzana C. Développement d'un biomatériau fonctionnalisé par des vésicules extracellulaires pour le traitement de l'insuffisance cardiaque sévère. Université Paris Cité; 2022.
200. Rosellini E, Cascone MG, Guidi L, Schubert DW, Roether JA, Boccaccini AR. Mending a broken heart by biomimetic 3D printed natural biomaterial-based cardiac patches: a review. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 16 nov 2023 [cité 16 avr 2025];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1254739/full>
201. Driesen RB, Verheyen FK, Dijkstra P, Thoné F, Cleutjens JP, Lenders MH, et al. Structural remodelling of cardiomyocytes in the border zone of infarcted rabbit heart. *Mol Cell Biochem.* 1 août 2007;302(1):225-32.
202. Gaetani R, Feyen DAM, Verhage V, Slaats R, Messina E, Christman KL, et al. Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials.* août 2015;61:339-48.
203. Jang J, Park HJ, Kim SW, Kim H, Park JY, Na SJ, et al. 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials.* janv 2017;112:264-74.
204. Bejleri D, Streeter BW, Nachlas ALY, Brown ME, Gaetani R, Christman KL, et al. A Bioprinted Cardiac Patch Composed of Cardiac-Specific Extracellular Matrix and Progenitor Cells for Heart Repair. *Adv Healthc Mater.* déc 2018;7(23):e1800672.
205. Yeung E, Fukunishi T, Bai Y, Bedja D, Pitaktong I, Mattson G, et al. Cardiac regeneration using human-induced pluripotent stem cell-derived biomaterial-free 3D-bioprinted cardiac patch in vivo. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(11):2031-9.
206. Omoto ACM, Gava FN, Silva CAA, Silva HB, Parente JM, Costa RM, et al. Lack of scarring is not always a sign of cardiac health: Functional and molecular characterization of the rat heart's following chronic reperfusion. *PLOS ONE.* 20 déc 2018;13(12):e0209190.

207. Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damås JK, Yndestad A. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med*. 2005;37(2):74-85.
208. Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med*. 21 janv 2008;205(2):295-303.
209. Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, et al. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation*. 7 juin 2005;111(22):2935-42.
210. Ghazal R, Wang M, Liu D, Tschumperlin DJ, Pereira NL. Cardiac Fibrosis in the Multi-Omics Era: Implications for Heart Failure. *Circ Res*. 28 mars 2025;136(7):773-802.
211. Sharma S, Mishra R, Bigham GE, Wehman B, Khan MM, Xu H, et al. A Deep Proteome Analysis Identifies the Complete Secretome as the Functional Unit of Human Cardiac Progenitor Cells. *Circ Res*. 3 mars 2017;120(5):816-34.
212. Yadid M, Lind JU, Ardoña HAM, Sheehy SP, Dickinson LE, Eweje F, et al. Endothelial extracellular vesicles contain protective proteins and rescue ischemia-reperfusion injury in a human heart-on-chip. *Sci Transl Med*. 14 oct 2020;12(565):eaax8005.
213. Gomes FG, Andrade AC, Wolf M, Hochmann S, Krisch L, Maeding N, et al. Synergy of Human Platelet-Derived Extracellular Vesicles with Secretome Proteins Promotes Regenerative Functions. *Biomedicine*. févr 2022;10(2):238.
214. Roefs MT, Bauzá-Martinez J, van de Wakker SI, Qin J, Olijve WT, Tuinte R, et al. Cardiac progenitor cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis through both associated- and co-isolated proteins. *Commun Biol*. 1 août 2023;6(1):1-16.
215. Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. déc 2021;14(1):1-24.
216. Kreutzer FP, Meinecke A, Schmidt K, Fiedler J, Thum T. Alternative strategies in cardiac preclinical research and new clinical trial formats. *Cardiovasc Res*. 21 févr 2022;118(3):746-62.
217. Montgomery RA, Mehta SA, Parent B, Griesemer A. Next steps for the xenotransplantation of pig organs into humans. *Nat Med*. août 2022;28(8):1533-6.
218. Mei X, Zhu D, Li J, Huang K, Hu S, Li Z, et al. A fluid-powered refillable origami heart pouch for minimally invasive delivery of cell therapies in rats and pigs. *Med*. 12 nov 2021;2(11):1253-1268.e4.
219. da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, Kerby J, Luo YH, Ahmado A, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol*. avr 2018;36(4):328-37.
220. Abellan Lopez M, Hutter L, Pagin E, Véliér M, Véran J, Giraudo L, et al. In vivo efficacy proof of concept of a large-size bioprinted dermo-epidermal substitute for permanent

wound coverage. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11:1217655.

221. Merck. Sigma-Aldrich. [cité 13 mai 2021]. International Society for Cellular Therapy (ISCT) Guidelines on Multipotent Human Mesenchymal Stem Cell (MSC) Characterization. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-culture/mesenchymal-stem-cell-characterization.html>

Stem Cell Research & Therapy

Short report – « Mesenchymal Stem Cell (MSC) and MSC-Derived Extracellular
Vesicles : Roles in Regenerative Medicine and Beyond »

1 **Repair of infarcted myocardium by skeletal muscle-derived mesenchymal**
2 **stromal cells delivered by a bioprinted collagen patch**

3 Rose Guesdon ^{a,b}, Serena Santoro ^a, Audrey Cras ^c, Etienne Pagin ^d, Didier Serteyn ^d, Justine Ceusters ^d,
4 Fabien Guillemot ^d, Albert Hagège ^e, Philippe Menasché ^{a,f}

5

6 ^a. Inserm UMR 970, PARCC, Université Paris Cité, Paris, France.

7 ^b. Poietis, Pessac, France.

8 ^c. Inserm UMR 1342, Centre d'investigation Clinique de Biothérapies CBT501, Paris, France.

9 ^d. Université de Liège, Centre de l'oxygène R&D, Sart-Tilman, Belgium

10 ^e. Department of Cardiology, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.

11 ^f. Department of Cardiovascular Surgery, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.

12

13 Corresponding authors :

14 Rose Guesdon : rose.guesdon@inserm.fr

15 Philippe Menasché : philippe.menasche@aphp.fr

16

17

18 Abstract

19 Mesenchymal stromal cells (MSC) are commonly investigated for post-infarction cardiac repair because
20 of their angiogenic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. However, autologous
21 sources (bone marrow and adipose tissue) require substantially invasive harvest procedures while
22 allogeneic MSC from the cord raise the issue of batch to batch variability. This study assessed the effects
23 of another under-investigated cell source: the skeletal muscle whose autologous MSC feature the
24 clinically appealing advantage of being retrievable by a minimally invasive micro biopsy. MSC
25 differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC) were selected as controls as they also look
26 clinically attractive because of their high scalability and high degree of reproducibility. *In vitro*, muscle-
27 derived (md) MSC exhibited typical MSC features including a tri-lineage differentiation potential and
28 had robust angiogenic, anti-inflammatory, anti-fibrotic and immune-modulatory effects. Overall, they
29 outperformed iPSC-MSC which raised a safety concern linked to the persistence of some pluripotency-
30 associated markers. They were thus chosen for the subsequent *in vivo* evaluation in a rat model of left
31 ventricular (LV) dysfunction induced by ischemia/reperfusion. To this end, mdMSC were embedded in
32 a collagen bioprinted gel; the resulting epicardially-delivered patch significantly improved LV ejection
33 fraction compared to a cell-free patch and sham-operated controls. Transcriptomic analysis revealed
34 that this benefit was accompanied by a downregulation of fibrosis-, apoptosis-, and inflammation-
35 related genes. This exploratory proof-of-concept study thus suggests that mdMSC offer an attractive
36 alternative because they combine an autologous origin with a minimally invasive harvest procedure.
37 Bioprinting these cells with a collagen bioink allows to generate a patch endowed with cardio-
38 reparative properties.

39

40 Key words : Heart failure, Stem cell therapy, Mesenchymal stromal cells, Cardiac patch

41

42

43 1. Introduction

44 Improved post-myocardial infarction (MI) survival has led to a rise in heart failure (HF) cases,
45 highlighting the need for new treatments when the conventional ones fail. Cell therapy is one of those
46 currently investigated and although the quest for the “ideal” cells continues, a great deal of interest is
47 paid to mesenchymal stromal cells (MSC) as they may contribute to cardiac repair via angiogenic, anti-
48 inflammatory, and immunomodulatory effects (1). While the collection of MSC derived from bone
49 marrow or adipose tissue require a fairly invasive procedure, those from the umbilical cord are fraught
50 with a substantial degree of lot-to-lot variability which makes challenging the yield of a consistent
51 Advanced Therapy Medicinal Product. Thus, alternative sources of MSC still warrant further
52 investigation. Among them, MSC from autologous skeletal muscle (mdMSC) have so far received less
53 attention and there is not even a mention of this source in an extensive review of the diverse sources
54 of MSC in the context of tissue regeneration (2) or in a recent compilation of MSC clinical trials (3).
55 However, their non-invasive collection via a micro biopsy procedure (Supplementary Figure 1), their
56 scalability (after 13,2 days $\pm$ 2,63 of culture, 15–20 mg of tissue yield $\approx$ 63,000 $\pm$ 30,675 cells) and the
57 observation that they share with the other sources of MSC robust paracrinally-mediated cell-protective
58 effects (4) provide a rationale to assess their potential relevance to cardiac repair.

59 This study was thus designed to first compare, *in vitro*, the effects of mdMSC with MSC from induced
60 pluripotent stem cells (iPSC-MSC) as, in a clinical perspective, the latter also look attractive, in the
61 perspective of a consistent product, because of their straightforward availability and their origin from
62 a well-defined cell line. The most effective and safer candidate turned out to be the mdMSC which
63 were then tested in a rat model of ischemia-reperfusion in combination with a bioprinted patch as, in
64 a translational perspective, this material was deemed to be well suited for a scalable and reproducible
65 clinical-grade manufacturing.

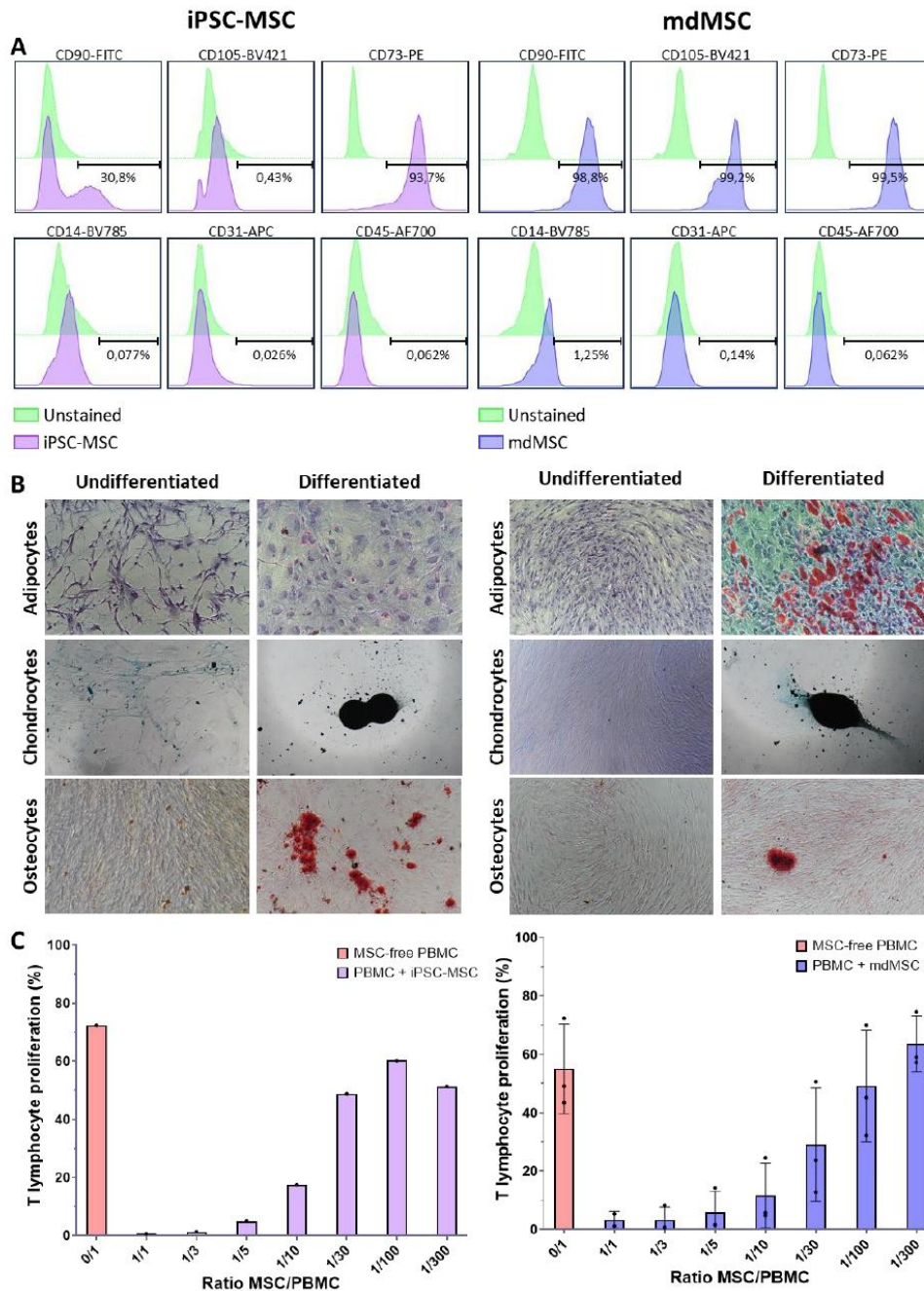
66

67 **2. Results**

68 *2.1. MSC characterization*

69 Flow cytometry was used to characterize iPSC-MSC and mdMSC, both of human origin. At passage 5,
70 mdMSC expressed CD90, CD105, and CD73 (Figure 1A) but no hematopoietic lineage markers (CD14,
71 CD31, and CD45). In contrast, iPSC-MSC exhibited a complete absence of CD105 and partial loss of
72 CD90, with only half of the population expressing it, while hematopoietic markers also remained
73 undetected. The expression of pluripotency-related transcription factors, analyzed at passages 0 and 5,
74 revealed the re-appearance over time of Sox2 and Oct3/4 within the iPSC-MSC population
75 (Supplementary Figure 2). A tri-lineage differentiation assay was then conducted (Figure 1B). After
76 several days of adipogenic induction, both MSC types exhibited specific morphological changes,
77 including lipid vacuole accumulation. Chondrogenic and osteogenic differentiation was also confirmed
78 using Alcian Blue and Alizarin Red S staining, respectively.

79 To further characterize MSC, their immunogenicity was assessed (Figure 1C). iPSC-MSC dose-
80 dependently inhibited T cell proliferation (left panel) while mdMSC were less immunosuppressive (right
81 panel).



82

83 *Figure 1 : Characterization of iPSC-MSC (left panel) and mdMSC (right panel). A : Flow cytometric analysis of iPSC-MSC at*
 84 *passage 3 (left) and mdMSC at passage 5 (right). MSC were stained for MSC and hematopoietic surface markers. mdMSC*
 85 *shown to express CD90, CD73, CD105, and no apparent CD45, CD14 and CD31. iPSC-MSC express CD73 only, and a third of the*
 86 *population also express CD90. Values show the percentage of positive cells (n=3 biological replicates). B : Assays for iPSC-MSC*
 87 *(left) and mdMSC (right) differentiation. MSC were cultured with lineage-specific media to induce cell differentiation.*

88 Differentiation into adipocytes, osteocytes and chondrocytes was detected by oil Red O, alizarin red and alcian blue,
89 respectively. Original magnification x20 (n=2 biological replicates). **C** : Effects of MSC on T-cell proliferation; a
90 mixed lymphocyte reaction (MLR) was performed by co-culturing Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) labeled with the
91 CellTrace™ Violet (CTV) Cell Proliferation Kit (Invitrogen) and the two types of MSC at different ratios; flow cytometry was
92 then used for selecting T lymphocytes using anti-CD3 and anti-CD45 antibodies and 7AAD; the proliferation of the CTV-labeled
93 selected lymphocyte proliferation was then fluorescently assessed (iPSC-MSC n=1, mdMSC n=3 biological replicates).

94

95 2.2. In vitro comparison of MSC

96 To evaluate the pro-angiogenic effects of MSC, a wound-healing assay was conducted on human
97 umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Incubation with iPSC-MSC and mdMSC significantly enhanced
98 wound closure, with the effect becoming more pronounced as the MSC dose increased. Notably,
99 mdMSC exhibited a stronger pro-angiogenic potential than iPSC-MSC (Figure 2A).

100 A second potency assay tested MSC for their anti-apoptotic potential. The outcome measure was the
101 viability of HUVEC following a one-hour exposure to staurosporine. Co-incubation with iPSC-MSC
102 resulted in a small improvement in HUVEC viability, which was not found with mdMSC at the
103 concentrations tested (Figure 2C).

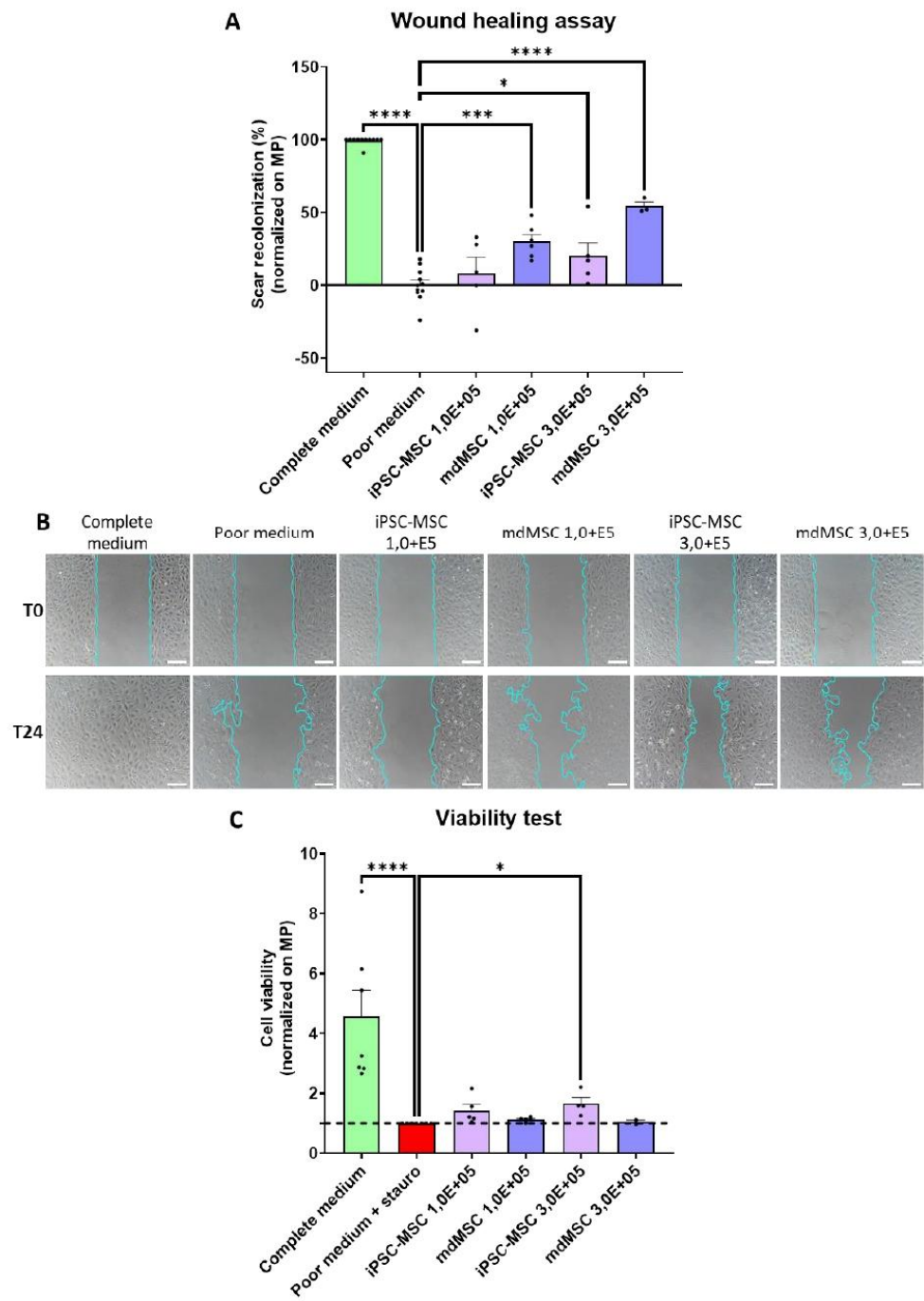


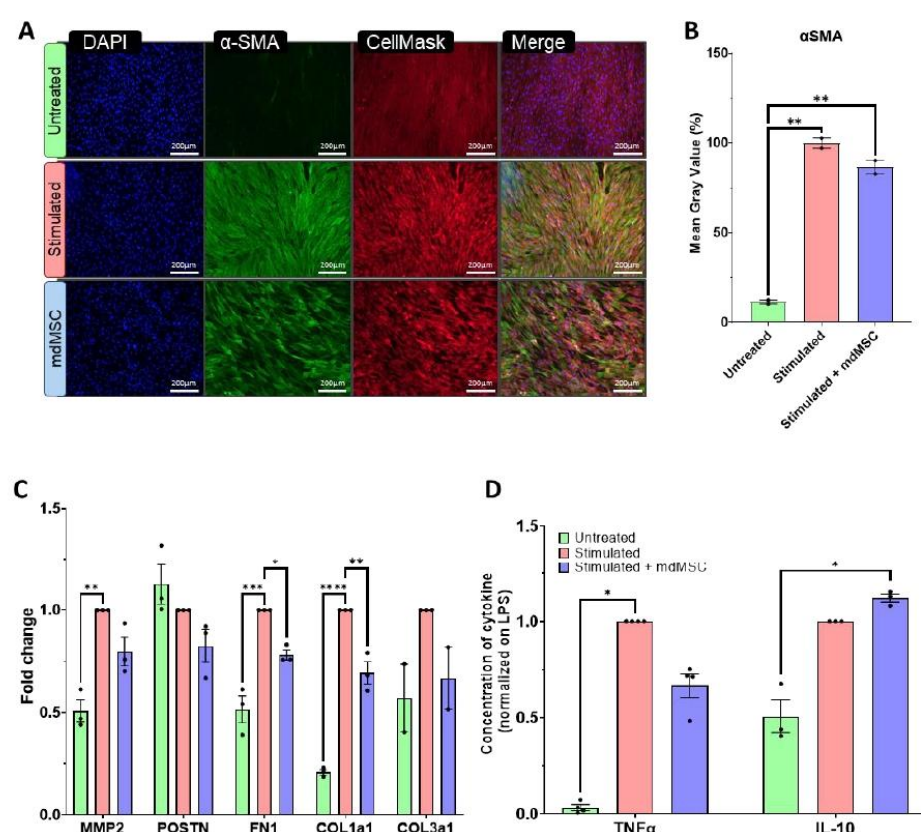
Figure 2 : Potency assay evaluating MSC. **A** : Wound healing assay. Results of scar recolonization were normalized to the control poor medium. Data are presented as means $\pm$ SEM. p value : $\leq 0,05$ (*), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****) Ordinary one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. **B** : Wound-heal photos under microscope at T0 et T24. Scale bars measure

108 1mm. C: Viability test evaluating anti-apoptotic effects. Results were normalized to the control MP. Data are presented as
109 means±SEM. p value ≤0,05(*), ≤0.0001(****) Kruskal-Wallis test with Dunnett's multiple comparisons test.

110

111 At the completion of this array of assays, the use of iPSC-MSC was considered problematic because of
112 the re-appearance of some of the pluripotency-associated markers with the increased number of
113 passages and their evaluation was thus discontinued because these transcription factors raised a risk
114 of oncogenicity expected to hamper safe clinical applications. mdMSC, in contrast, were further
115 assessed *in vitro* for their anti-fibrotic and anti-inflammatory properties. To this end, human cardiac
116 fibroblasts (HCF) were first stimulated with TGF-β1, L-ascorbic acid and sulfate dextran which resulted
117 in fibroblast activation (Figure 3A). Incubation of HCF with mdMSC led to a decrease in αSMA
118 expression (Figure 3B) taken as a read-out for an anti-fibrotic effect. This was further supported by PCR
119 analysis, which revealed a significant downregulation of the fibrosis-associated genes *FN1* and *COL1A1*,
120 while *POSTN*, *MMP2*, and *COL3A1* exhibited a similar downward trend (Figure 3C). Finally, an
121 inflammation assay was conducted using LPS-stimulated THP-1 monocytes. LPS stimulation followed
122 by incubation with mdMSC resulted in a reduction of the pro-inflammatory cytokine TNFα compared
123 to the LPS-only control (stimulated condition), paralleled by an increased secretion of the anti-
124 inflammatory cytokine IL-10 (Figure 3D). These findings are further supported by the analysis of the
125 MSC secretome using a Luminex multiplex assay (Supplementary Figure 5) performed under both basal
126 conditions and after IFN-γ priming to simulate an inflammatory environment. The results revealed the
127 secretion of several key cytokines with therapeutic potential. More specifically, Interleukin 6 (IL-6),
128 known for its role in resolving inflammation and promoting myocardial repair post-infarction (5), was
129 consistently expressed. Interferon γ-induced protein 10 (IP-10) was only detected after priming and is
130 associated with improved left ventricular (LV) recovery and targeted immune modulation (6).
131 Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) secretion markedly increased under inflammatory
132 conditions, and may play a role in recruiting pro-regenerative M2 macrophages (7). Platelet-derived
133 growth factor AA (PDGF-AA), may support post-infarction cardiac repair by enhancing angiogenesis and
134 regulating fibroblast and inflammatory responses, was present at low levels and showed a slight

135 decrease following priming (8,9). Finally, vascular endothelial growth factor (VEGF), a central
 136 angiogenic factor that supports neovascularization and enhances myocardial perfusion, was secreted
 137 steadily regardless of inflammatory stimulation (10,11).
 138 Put together, these *in vitro* data were considered encouraging enough to warrant proceeding to an *in*
 139 *vivo* assessment of mdMSC.
 140



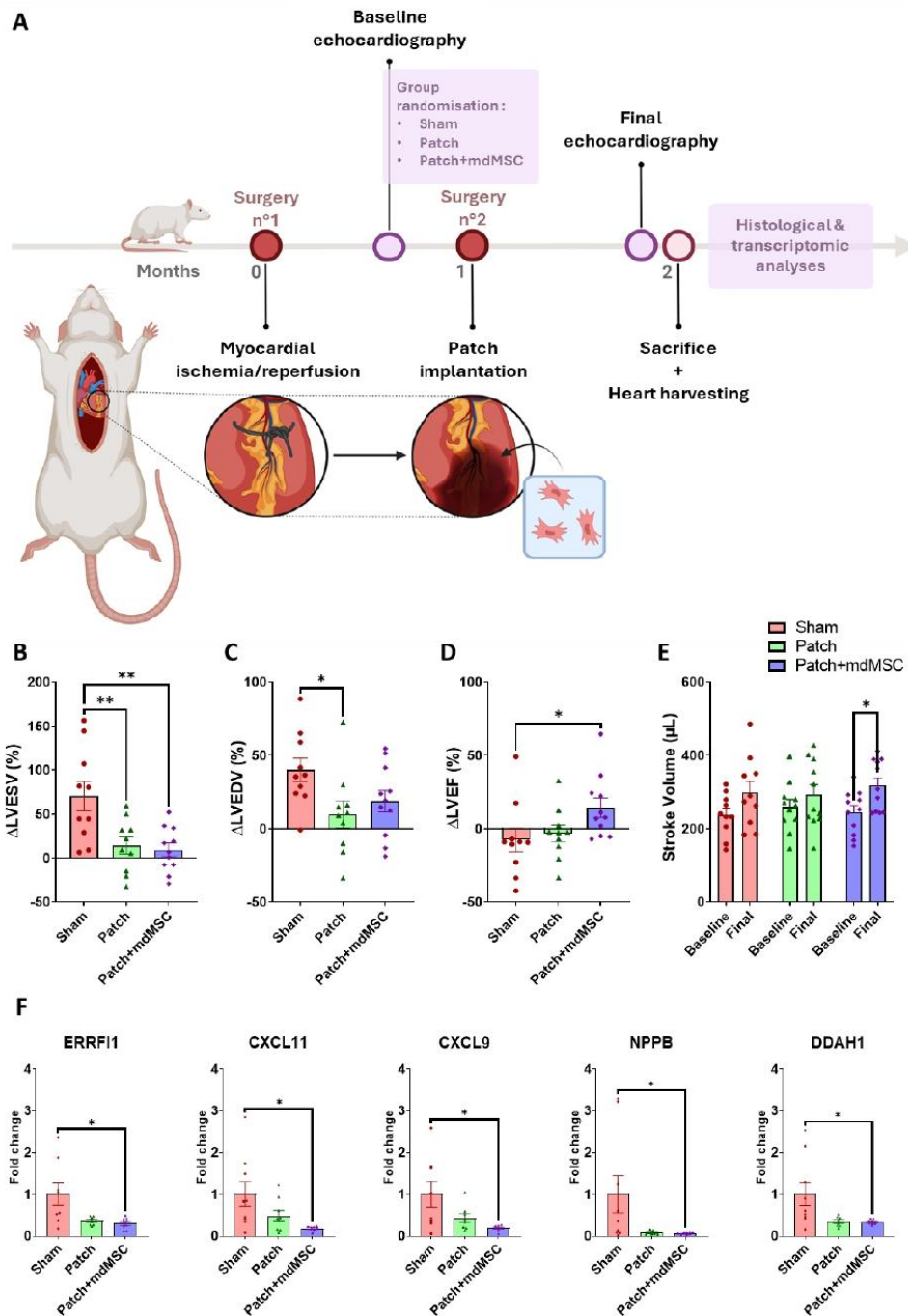
141
 142 **Figure 3 : Potency assay evaluating mdMSC.** A-B : HCF imaging and quantification of mean fluorescence of α SMA. Scale bars
 143 measure 200 μ m. Data are presented as means $\pm$ SEM. *p* value : ≤ 0.01 (**) Ordinary one-way ANOVA with Dunnett's multiple
 144 comparisons test (*n*=2 biological replicates). C : Expression of fibrosis-associated genes by HCF stimulated with TGF- β 1, L-
 145 ascorbic acid and sulfate dextran. Data are presented as means $\pm$ SEM. *p* value : ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), ≤ 0.001 (***),
 146 ≤ 0.0001 (****) Ordinary one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. D : ELISA-based quantification of pro-
 147 inflammatory (TNF α) or anti-inflammatory (IL-10) cytokine production in THP-1 cells, with or without LPS stimulation. Data
 148 are presented as means $\pm$ SEM. *p* value : ≤ 0.05 (*), Kruskal-Wallis test with Dunnett's multiple test correction.

149

150 2.1. *In vivo* evaluation of the mdMSC-functionalized bioprinted collagen patch in a rat
151 *model of left ventricular dysfunction*

152 Seventy immune-competent rats underwent a 45-minute myocardial ischemia followed by reperfusion
153 (Figure 4A). Three weeks following the induction of MI, a baseline echocardiography was performed
154 and only rats with a LV ejection fraction (LVEF) $\leq 60\%$ were reoperated on and randomly assigned to
155 one of the following three groups: sham (thoracotomy alone, n=10), bioprinted a-cellular patch (n=10),
156 or bioprinted patch seeded with 100,000 mdMSC (n=11). Bioprinting used acid-soluble bovine type I
157 collagen as the bio-ink and was achieved by extrusion, which yielded a solid elastic hydrogel. Flow
158 cytometry performed three days post-extrusion showed a high ($>90\%$) proportion of viable (calcein⁺)
159 cells. The patches were applied onto the epicardium of the heart with a hemostatic sponge (TachoSil®)
160 placed at their outer surface and gently pressed to help the patch adhering to the heart. One month
161 post-treatment, rats were re-assessed echocardiographically. All data were outsourced to a core
162 laboratory when they were blindly analyzed. In both treatment groups, LV endsystolic volumes (LVESV)
163 increased to a smaller extent from their respective baseline values (by $14.4 \pm 9.6\%$ in patch group and
164 $9.1 \pm 7.6\%$ in patch+mdMSC group) than in sham group where they increased by $70.3 \pm 16.8\%$ (Figure
165 4B). Left ventricular enddiastolic volumes (LVEDV) were also lower in the two patch-treated groups
166 (Figure 4C). As a result, LVEF declined from baseline by $-7.6 \pm 8.2\%$ in the sham group; the patch-alone
167 group showed an only minor decrease ($-3.2 \pm 5.6\%$), while in the patch+mdMSC group LVEF improved
168 by $14.4 \pm 6.5\%$ (Figure 4D). In line with these findings, the stroke volume was significantly elevated in
169 the patch+mdMSC group (Figure 4E) where the enhanced cardiac function was further supported by
170 the analysis of effect size which demonstrated the superiority of the cellularized patch over both its a-
171 cellular counterpart and sham-operated controls (Supplementary Figure 3). Infarct size did not differ
172 among groups (Supplementary Figure 4). A transcriptomic analysis of heart tissue was performed by
173 RT-qPCR (Figure 4F). Compared to the sham group, the patch+mdMSC group showed a significant
174 reduction in the expression of genes associated with HF (*Ddah1*, *Nppb*), inflammation (*Cxcl11*, *Cxcl9*),

175 and apoptosis (*Errfi1*). The patch-alone group also exhibited a downward trend in inflammatory
176 markers.



177

178 Figure 4 : In vivo evaluation of the mdMSC-loaded collagen patch in a rat model of left ventricular dysfunction. A : Experimental
179 design. B-E : Changes in endsystolic (B) and enddiastolic (C) volumes and in LVEF (D) from baseline; Stroke Volume given in
180 absolute values (E). Sham (n = 10), patch (n = 10), and patch+mdMSC (n = 11). Data are presented as means±SEM. p value:

181 $\leq 0.05(*)$, $\leq 0.01(**)$ - **B-C** : Ordinary one-way ANOVA with Dunnett's multiple test correction, **D** : Kruskal-Wallis test with
 182 Dunnett's multiple test correction, **E** : Repeated measures two-way ANOVA with Tukey's multiple test correction. **F** : Fold change
 183 in the expression of genes involved in apoptosis (*Erf1*), inflammation (*Cxcl11*, *Cxcl9*), and heart failure (*Nppb*, *Ddha1*) in the
 184 three experimental groups: sham ($n = 8$), patch ($n = 8$), and patch+mdMSC ($n = 9$). Data are presented as means $\pm$ SEM. *p* value
 185 : $\leq 0.05(*)$ Kruskal-Wallis test with Dunnett's multiple test correction.

186

187 3. Discussion and Conclusions

188 This study was driven by three clinically-oriented considerations: avoiding the immune response by
 189 using autologous cells; possibility to collect them by a minimally invasive procedure; and optimizing
 190 their engraftment by combining them with a scaffold. The integration of these three guidelines led us
 191 to assess the effects of mdMSC embedded in a bioprinted collagen patch.

192 While mdMSC share with the other main sources of autologous MSC (bone marrow and adipose tissue)
 193 a high scalability, they offer the distinct, clinically relevant advantage of a possible procurement by a
 194 minimally invasive procedure thanks to a unique muscle microbiopsy procedure (Supplementary Figure
 195 1) developed by Ceusters et al. (4,12). As a comparator, we selected iPSC-MSC which are also clinically
 196 attractive because their origin from a well-defined cell line along with a tight standardization of
 197 differentiation and expansion protocols are expected to yield a reproducible product (13). However, we
 198 found that they did not fully match the whole set of criteria established by The International Society
 199 for Cellular Therapy (ISCT) in that they failed to fully express MSC-specific markers and, more
 200 noticeably, still demonstrated some of the iPSC-associated pluripotency factors (14). The safety
 201 concern raised by the persistence of these markers (15) led us to privilege MSC from a muscular origin.

202 In our *in vitro* assays, these cells featured robust angiogenic and immune-modulatory effects. Of further
 203 relevance to the pathophysiology of the ischemic myocardium, mdMSC also demonstrated anti-fibrotic
 204 and anti-inflammatory properties in *in vitro* assays using stimulated fibroblasts and monocytes,
 205 respectively. Luminex analysis further confirmed the secretion of cytokines contributing to cardiac
 206 repair, with IFN- γ priming enhancing the secretion by mdMSC of IL-6, MCP-1, and IP-10, while VEGF
 207 remained consistently expressed regardless of any priming, supporting both immunomodulatory and
 208 pro-angiogenic functions.

209 These benefits were recapitulated in the *in vivo* model of chronic LV dysfunction where mdMSC
210 improved the functional outcomes beyond those seen in the patch-alone group, thereby suggesting
211 the cardio-protective effects of these cells possibly attributable to their paracrine effects demonstrated
212 by the *in vitro* assays (5).

213 Beyond the nature of the cells, their mode of delivery is a critical factor of the ultimate outcome.
214 Multiple intramyocardial injections have been initially used but their limitations are now recognized,
215 which include needle-related damage to the cells; disruption of the extracellular matrix and
216 subsequent loss of signals modulating cell survival and patterning; an inhomogeneous, difficult to
217 standardize distribution; and the creation of potential arrhythmogenic clusters (16–18). These hurdles
218 can be overcome by the use of an epicardially delivered patch serving as a platform for the cells
219 expected to act primarily through the release of paracrine mediators, without integration in the
220 myocardium which is a safety net against arrhythmias. mdMSC were thus encapsulated in a collagen
221 gel manufactured by bioprinting because this approach allows to carefully control the distribution of
222 the cells while being amenable to a standardized large-scale production (19,20). Indeed, the naked
223 collagen patch yet provided some degree of cardiac preservation compared with sham-operated rats,
224 in line with the well-documented benefits of collagen (21,22), but the patch-associated improvement
225 in the functional outcomes was further enhanced when the collagen bioink was combined with the
226 mdMSC, suggesting a synergistic effect of the cells and the hydrogel. This result aligns with previous
227 reports documenting the benefits of diverse combinations of cells and bioinks : progenitor cardiac cells
228 in a mix of gelatin and hyaluronic acid (23); progenitor cardiac cells and MSC in a decellularized
229 extracellular matrix (24,25); and even iPSC-derived cardiomyocytes, endothelial cells and fibroblasts
230 clustered in bioprinted scaffold-free cardiospheres (26). That the bioprinted patch improved function
231 without significantly reducing infarct size is not an uncommon observation as cardiac function and the
232 macroscopic size of cardiac scars have previously been shown to be possibly uncoupled readouts (27).
233 Indeed, one month post-infarction, the fibrotic scar is already fixed, and any functional improvement
234 is expected to be mainly due to the preservation of the still viable myocardium mediated by the

235 paracrine effects of both the transplanted cells and the collagen biomimetic properties, as suggested
236 by our transcriptomic data collected following implantation of both cellular and acellular patches.
237 In summary, this study does not claim the superiority of mdMSC over the other commonly used MSC
238 but suggests that these cells may enrich the landscape of cardiac cell therapy by providing an attractive
239 source of autologous cells retrievable by a minimally invasive harvesting method. Bioprinting mdMSC
240 with a biocompatible material with a long-standing safety record like collagen allowed the
241 straightforward production of a clinically usable patch endowed with cardio-reparative properties.

242

243 **List of abbreviations**

244 EV : Extracellular Vesicle
245 HCF : Human Cardiac Fibroblasts
246 HF : Heart Failure
247 HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
248 IL-10 : interleukin 10
249 IL-6 : interleukin 6
250 IP-10 : Interferon γ -Induced protein 10
251 iPSC : induced Pluripotent Stem Cells
252 iPSC-MSC : iPSC derived Mesenchymal Stromal Cell
253 LPS : Lipopolysaccharide
254 LV : Left Ventricular
255 LVEDV : Left Ventricular Ejection Diastolic Volume
256 LVEF : Left Ventricular Ejection Fraction
257 LVESV : Left Ventricular Ejection Systolic Volume
258 MCP 1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

259 mdMSC : muscle derived Mesenchymal Stromal Cell
260 MI : Myocardial Infarction
261 MSC : Mesenchymal Stromal Cell
262 PDGF AA : Platelet-Derived Growth Factor AA
263 TNF α : Tumor Necrosis Factor α
264 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
265 α SMA : α -Smooth Muscle Actin
266

267 **References**

- 268 1. Guo Y, Yu Y, Hu S, Chen Y, Shen Z. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for
269 cardiovascular diseases. *Cell Death Dis.* 2020 May 11;11(5):349.
- 270 2. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell
271 therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Sep;13(9):1738–55.
- 272 3. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell
273 Therapy. *Stem Cell Rev Rep.* 2022 Jun;18(5):1525–45.
- 274 4. Ceusters J, Lejeune JPh, Sandersen C, Niesten A, Lagneaux L, Serteyn D. From skeletal muscle to
275 stem cells: an innovative and minimally-invasive process for multiple species. *Sci Rep.* 2017 Apr
276 6;7:696.
- 277 5. Zhu H, Liu X, Ding Y, Tan K, Ni W, Ouyang W, et al. IL-6 coaxes cellular dedifferentiation as a pro-
278 regenerative intermediate that contributes to pericardial ADSC-induced cardiac repair. *Stem Cell*
279 *Res Ther.* 2022 Jan 31;13(1):44.
- 280 6. Sopova K, Tual-Chalot S, Mueller-Hennessen M, Vlachogiannis NI, Georgiopoulos G, Biener M, et
281 al. Effector T cell chemokine IP-10 predicts cardiac recovery and clinical outcomes post-myocardial
282 infarction. *Front Immunol* [Internet]. 2023 Jun 22 [cited 2025 Jun 27];14. Available from:
283 <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1177467/full>
- 284 7. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical
285 implications. *Clin Sci.* 2009 Jul 2;117(3):95–109.
- 286 8. Medamana J, Clark RA, Butler J. Platelet-Derived Growth Factor in Heart Failure. In: Bauersachs J,
287 Butler J, Sandner P, editors. *Heart Failure* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016
288 [cited 2025 Jun 29]. p. 355–69. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 243). Available
289 from: http://link.springer.com/10.1007/164_2016_80
- 290 9. Zhao W, Zhao T, Huang V, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Platelet-Derived Growth Factor Involvement in
291 Myocardial Remodeling following Infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Nov;51(5):830–8.
- 292 10. Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, Lee T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic
293 trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys*
294 *Res Commun.* 2009 Dec 18;390(3):834–8.
- 295 11. Markel TA, Wang Y, Herrmann JL, Crisostomo PR, Wang M, Novotny NM, et al. VEGF is critical for
296 stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold
297 in adult and neonatal stem cell function. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2008 Dec;295(6):H2308–
298 14.
- 299 12. Serteyn D, Ceusters J. New Uses Of Mammalian Muscle-Derived Stem Cells [Internet].
300 US20210116441A1, 2021 [cited 2025 Apr 14]. Available from:
301 <https://patents.google.com/patent/US20210116441A1/fr>
- 302 13. Khan MA, Alanazi F, Ahmed HA, Shamma T, Kelly K, Hammad MA, et al. iPSC-derived MSC therapy
303 induces immune tolerance and supports long-term graft survival in mouse orthotopic tracheal
304 transplants. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Sep 23;10(1):290.

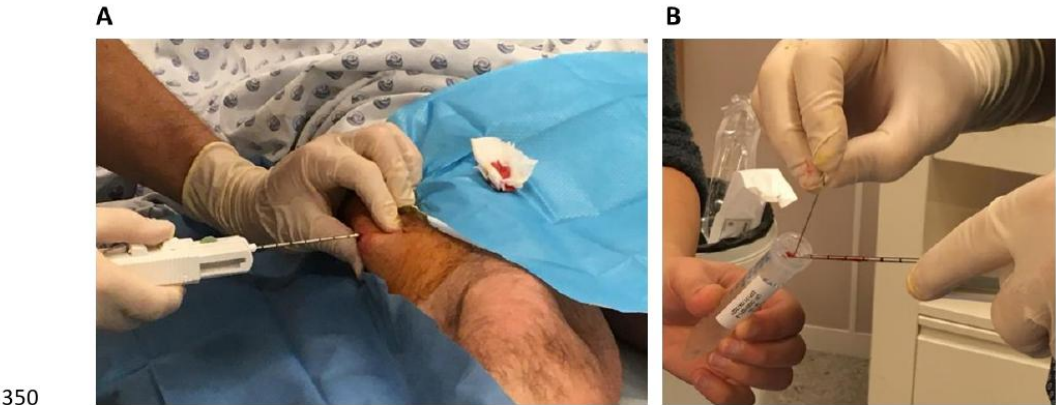
- 305 14. Choudhery MS, Mahmood R, Harris DT, Ahmad FJ. Minimum criteria for defining induced
306 mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2022 Jun;46(6):986–9.
- 307 15. Zhao C, Ikeya M. Generation and Applications of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived
308 Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2018;2018:9601623.
- 309 16. van den Akker F, Feyen DAM, van den Hoogen P, van Laake LW, van Eeuwijk ECM, Hoefer I, et al.
310 Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow. *Eur Heart J*. 2017 Jan 14;38(3):184–6.
- 311 17. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, et al. Direct intramyocardial
312 but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat
313 chronic ischemic heart failure model. *Circulation*. 2007 May 1;115(17):2254–61.
- 314 18. Aguado BA, Mulyasmita W, Su J, Lampe KJ, Heilshorn SC. Improving Viability of Stem Cells During
315 Syringe Needle Flow Through the Design of Hydrogel Cell Carriers. *Tissue Eng Part A*. 2012
316 Apr;18(7–8):806–15.
- 317 19. Silva LP. Current Trends and Challenges in Biofabrication Using Biomaterials and Nanomaterials:
318 Future Perspectives for 3D/4D Bioprinting. In: 3D and 4D Printing in Biomedical Applications
319 [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2019 [cited 2021 Oct 5]. p. 373–421. Available from:
320 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527813704.ch15>
- 321 20. Derakhshanfar S, Mbeleck R, Xu K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D bioprinting for biomedical devices
322 and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact Mater*. 2018 Jun
323 1;3(2):144–56.
- 324 21. Muthukumar T, Sreekumar G, Sastry TP, Chamundeeswari M. Collagen as a Potential Biomaterial
325 in Biomedical Applications. *Rev Adv Mater Sci*. 2018 Jan 1;53(1):29–39.
- 326 22. Serpooshan V, Zhao M, Metzler SA, Wei K, Shah PB, Wang A, et al. The effect of bioengineered
327 acellular collagen patch on cardiac remodeling and ventricular function post myocardial infarction.
328 *Biomaterials*. 2013 Dec 1;34(36):9048–55.
- 329 23. Gaetani R, Feyen DAM, Verhage V, Slaats R, Messina E, Christman KL, et al. Epicardial application
330 of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function
331 after myocardial infarction. *Biomaterials*. 2015 Aug;61:339–48.
- 332 24. Jang J, Park HJ, Kim SW, Kim H, Park JY, Na SJ, et al. 3D printed complex tissue construct using stem
333 cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials*. 2017
334 Jan;112:264–74.
- 335 25. Bejleri D, Streeter BW, Nachlas ALY, Brown ME, Gaetani R, Christman KL, et al. A Bioprinted Cardiac
336 Patch Composed of Cardiac-Specific Extracellular Matrix and Progenitor Cells for Heart Repair. *Adv*
337 *Healthc Mater*. 2018 Dec;7(23):e1800672.
- 338 26. Yeung E, Fukunishi T, Bai Y, Bedja D, Pitaktong I, Mattson G, et al. Cardiac regeneration using human-
339 induced pluripotent stem cell-derived biomaterial-free 3D-bioprinted cardiac patch in vivo. *J Tissue*
340 *Eng Regen Med*. 2019;13(11):2031–9.
- 341 27. Omoto ACM, Gava FN, Silva CAA, Silva HB, Parente JM, Costa RM, et al. Lack of scarring is not
342 always a sign of cardiac health: Functional and molecular characterization of the rat heart's
343 following chronic reperfusion. *PLOS ONE*. 2018 Dec 20;13(12):e0209190.

344 28. Nicotra T, Desnos A, Halimi J, Antonot H, Reppel L, Belmas T, et al. Mesenchymal stem/stromal cell
345 quality control: validation of mixed lymphocyte reaction assay using flow cytometry according to
346 ICH Q2(R1). Stem Cell Res Ther. 2020 Oct 1;11(1):426.

347

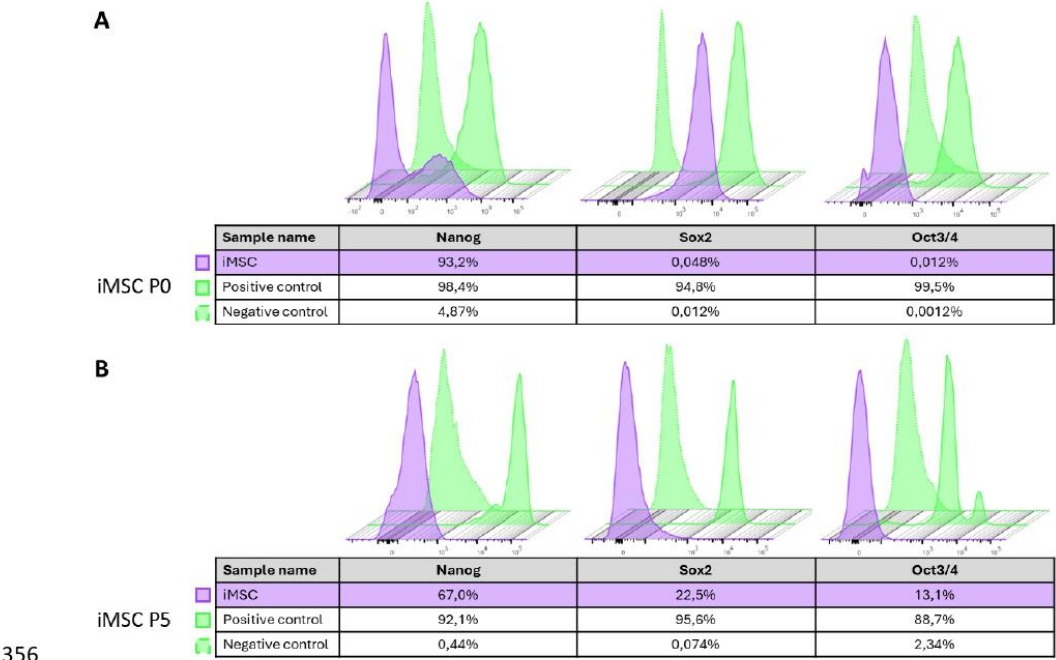
348

349 **Supplementary data**



351 *Supplementary Figure 1 : Pictures of the harvest procedure of muscle by a microbiopsy. (A) Collection of the muscle microbiopsy*
352 *using a 14-gauge semi-automatic microbiopsy needle. The sampling site is shaved and aseptically prepared, a local anesthetic*
353 *is injected subcutaneously, and the microbiopsy is collected via a small skin puncture. (B) Upon immediate collection, each*
354 *sample is transferred to culture medium and stored at 4°C until use.*

355



356

357 *Supplementary Figure 2 : Flow cytometric analysis of the expression of transcription factors Nanog, Sox2, and Oct3/4 in iPSC-*
358 *MSC (violet: population of interest; solid green: positive control; dashed green: negative control). (A) iPSC-MSC at passage 0.*
359 *(B) iPSC-MSC at passage 5.*

360

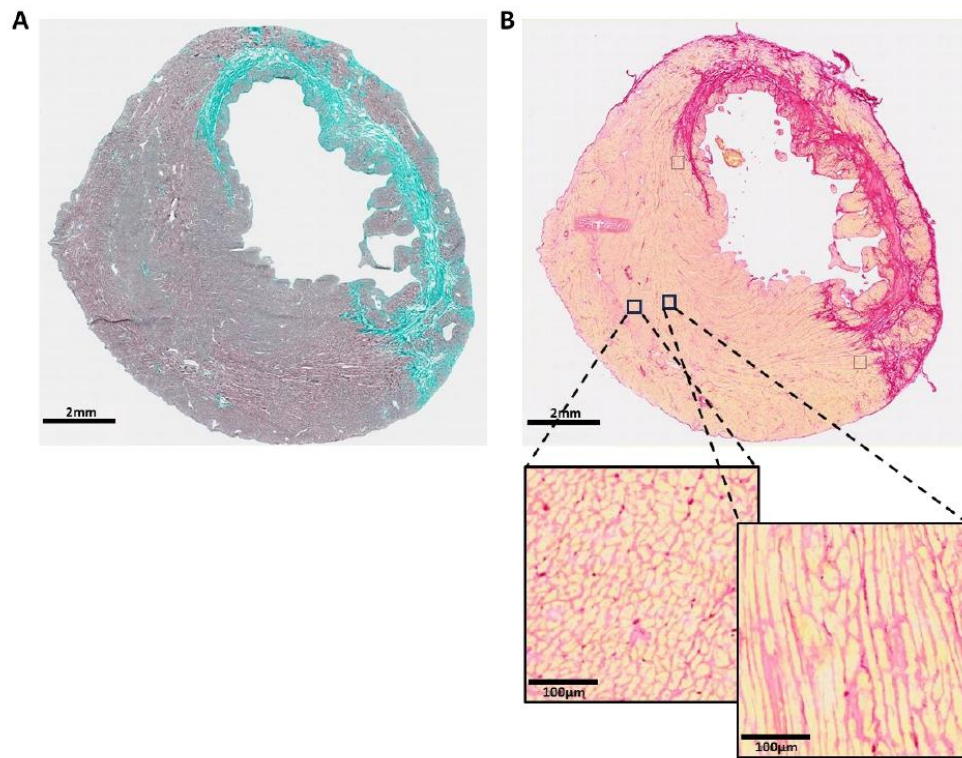
	Sham	Patch	Patch+mdMSC
Number of values	10	10	11
LVEF values (difference from baseline)	-22,78%	-2,19%	2,12%
	-42,33%	-20,54%	24,56%
	-8,93%	12,61%	-5,54%
	-33,65%	-2,51%	11,11%
	17,60%	2,43%	6,81%
	-8,96%	-11,94%	-7,00%
	-10,54%	-6,86%	-4,99%
	-6,87%	-33,42%	7,60%
	-9,25%	32,66%	22,33%
	49,25%	-2,30%	64,65%
			36,27%
Mean	-7,65	-3,21	14,36
SD	25,82	17,87	21,60

Groups	Sham vs Patch	Sham vs Patch+mdMSC	Patch vs Patch+mdMSC
Mean1-Mean2	4,44	22,00	17,56
Pooled SD	22,20	23,69	19,92
Cohen's d	0,20	0,93	0,88
Effect size	Small	Large	Large

361

362 *Supplementary Figure 3 : Effect size measurement using Cohen's d index comparing treated groups (patch-alone and*
363 *patch+mdMSC) versus untreated group (sham).*

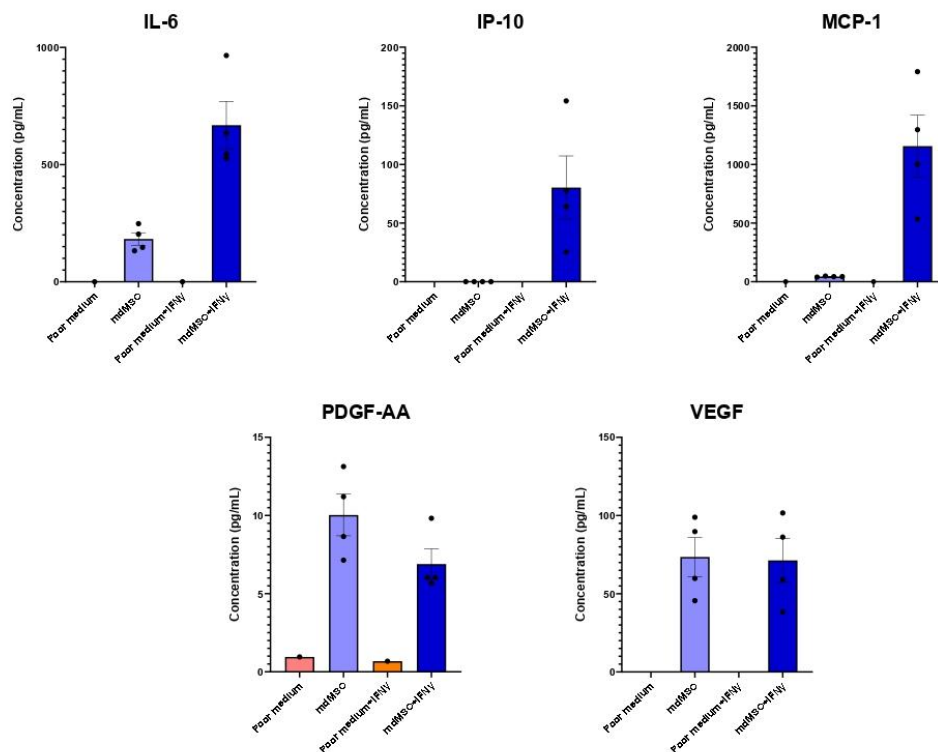
364



365

366 *Supplementary Figure 4 : Histological images of infarcted rat heart sections. A : Masson's trichrome staining. B : staining with*
 367 *Sirius red and zoom on interstitial fibrosis. Scale bars: 2 mm (overview), 100 µm (zoom).*

368



Supplementary Figure 5 : Quantification of MSC-secreted cytokines (IL-6, IP-10, MCP-1, PDGF-AA, VEGF) under basal and IFN- γ -primed conditions using Luminex multiplex assay (n=4 biological replicates).

Materials and Methods

iPSC-MSC cell culture

Cryopreserved iPSC-derived MSC (iCell® Mesenchymal Stem Cells, FUJIFILM Cellular Dynamics International, Inc, WI, États-Unis) are thawed and seeded at a density of 35,000 cells/cm² in RoosterNourish™-CSM-XF culture medium (RoosterBio, Frederick, MD, États-Unis) supplemented with 1% antimycotic antibiotic solution (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis). The cells are then placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂. The medium is changed every 6 days until the cells reach 80% confluence (passage 0). The cells are then detached with trypsin-EDTA (ThermoFisher, Waltham,

381 MA, États-Unis) collected and reseeded at a density of 5,000 cells/cm² up to passage 2 to build up a
382 bank.

383

384 **mdMSC cell culture**

385 Cryopreserved MSC are thawed and seeded at a density of 35,000 cells/cm² in MesenCult™
386 Proliferation Kit culture medium (StemCell, Vancouver, BC, Canada) supplemented with 1% antimycotic
387 antibiotic solution (Sigma-Aldrich). Cells are then placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂. The
388 medium is changed the day after thawing, then every 2 days until the cells reach 80% confluence
389 (passage 4). Cells are then detached with TrypLE™ Express (ThermoFisher), collected and reseeded at
390 a density of 5,000 cells/cm² up to passage 2 to build up a bank.

391

392 **Flow Cytometry Characterization of MSC**

393 MSC were analyzed by flow cytometry using surface markers CD90 (FITC, clone 5A10, Biolegend, San
394 Diego, CA, États-Unis), CD105 (BV421™, clone 43A3, Biolegend), and CD73 (PE, clone AD2, Biolegend).
395 Hematopoietic markers CD14 (BV786, clone M5E2, BD Biosciences), CD45 (AF700, clone 2D1,
396 Biolegend), CD31 (APC, clone WM59, Biolegend), and HLA-DR (PE/Cy7, clone L243, Biolegend) were
397 used to confirm their absence. Negative controls included unstained MSCs and PBMCs.

398 iPSC-MSC were stained for Nanog (Vio B515, clone REA314, Miltenyi Biotec), Sox2 (PE, clone REA320,
399 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), and Oct3/4 (APC, clone REA622, Miltenyi Biotec) using
400 the Transcription Factor Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec), following the manufacturer's protocol.
401 Controls included unstained iPSC-MSC and iPSC.

402 Samples were acquired using a LSRFortessa™ X-20 cytometer (BD Biosciences) and analyzed with
403 FlowJo v10.10.0 (BD Biosciences).

404

405 **Differentiation into chondrocytes, adipocytes and osteocytes**

406 The ability of MSC to differentiate into adipocytes, chondrocytes and adipocytes was assessed using
407 the following kits: StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher), StemPro®
408 Chondrogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher), StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit
409 (ThermoFisher). These kits were used according to the supplier's recommendations.

410

411 The immunosuppressive capacity of mdMSCs and iPSC-MSC was assessed using a mixed lymphocyte
412 reaction (MLR) assay adapted from Nicotra et al. (160). MSCs were pretreated with IFN-γ for 48 h prior
413 to co-culture. PBMCs from 10 healthy donors were labeled with CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit
414 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and co-cultured with MSCs at ratios of 0:1 (control), 1:1, 1:3, 1:5, 1:10,
415 1:30, 1:100, and 1:300 (MSC:PBMC).

416

417 **Mixed Lymphocyte Reaction**

418 The immunosuppressive capacity of mdMSC and iPSC-MSC was assessed using a mixed lymphocyte
419 reaction (MLR) assay adapted from Nicotra et al (28). MSC were pretreated with IFN-γ for 48 h prior to
420 co-culture. PBMC from 10 healthy donors were labeled with CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit
421 (Invitrogen) and co-cultured with MSC at ratios of 0:1 (control), 1:1, 1:3, 1:5, 1:10, 1:30, 1:100, and
422 1:300 (MSC:PBMC). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with GlutaMAX™, HEPES
423 (ThermoFisher), 10% human AB serum (Eurobio, Les Ulis, France), 1% Amphotericin
424 B/Penicillin/Streptomycin (ThermoFisher), and 10 IU/mL Heparin (PanPharma, Luitré, France), at 37°C
425 with 5% CO₂. On day 4, 50 µL of fresh medium was added. On day 7, cells were stained with anti-human
426 CD3-PE (BD Biosciences), CD45-FITC (BD Biosciences), and viability dye 7-AAD (Beckman Coulter,
427 Villepinte, France) for 15 min at 4°C in the dark.

428 Cells were washed with PBS and analyzed using an Attune NxT™ Flow Cytometer (ThermoFisher), and
429 data were processed with Attune NxT™ software.

430

431 **Scratch test**

432 Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Promocell, Heidelberg, Allemagne) at early passages
433 (P2–P6) are seeded at 40,000 cells/well in 2-well culture inserts (Ibidi GmbH, Munich, Germany) placed
434 in 24-well plates with Endothelial Cell Growth Medium (Promocell) supplemented with 1% antibiotic–
435 antimycotic (Sigma-Aldrich), and incubated at 37°C with 5% CO₂.

436 In parallel, iPSC-MSC and mdMSC are seeded at 100,000 or 300,000 cells/well in 6.5 mm Transwell®
437 inserts (0.4 µm pore, Corning, Kennebunk, ME, USA), in RoosterNourish™-CSM-XF medium
438 (RoosterBio) and MesenCult™ medium (StemCell) respectively, and incubated under the same
439 conditions for 24h.

440 Once HUVEC reach confluence, inserts are removed to create a 500 µm wound. Wells are then filled
441 with:

- 442 • Positive control : complete medium (basal + 10% FBS)
- 443 • Negative control : basal medium only
- 444 • MSC condition : basal medium + MSC in Transwell

445 Images are taken at T0 and T24 h, and wound closure is assessed by comparing the cell-free area
446 between both time points.

447

448 **Viability test**

449 Wells of a 24-well plate are coated with 0.1% gelatin. HUVEC (Promocell, passages 2–6) are seeded at
450 90,000 cells/well in Endothelial Cell Growth Medium (Promocell) supplemented with 1% antibiotic–
451 antimycotic solution (Sigma-Aldrich).

452 In parallel, iPSC-MSC and mdMSC are seeded at 100,000 or 300,000 cells/well in 6.5 mm Transwell®
453 inserts (0.4 µm pores, Corning) using RoosterNourish™-CSM-XF (RoosterBio) or MesenCult™ (StemCell)
454 media, respectively, each supplemented with 1% antibiotic–antimycotic. All cells are incubated at
455 37 °C, 5% CO₂ for 24h.

456 The next day, HUVECs are treated with 0.05 μ M staurosporine (Cell Signaling Technology, Danvers, MA,
457 USA) in basal medium (without supplements) for 1 h, then gently rinsed twice. Wells are then filled
458 with :

- 459 • Positive control : complete medium (basal + 10% FBS)
- 460 • Negative control : basal medium
- 461 • MSC condition : basal medium with Transwell inserts containing MSC

462 After 24 h, cell viability is assessed using the CCK-8 assay (Sigma-Aldrich, 1:10 dilution, 3 h incubation
463 at 37°C). Absorbance at 450 nm is measured using a SPECTROstar Nano spectrophotometer (BMG
464 LABTECH, Ortenberg, Allemagne), and data are analyzed with MARS software. Results are normalized
465 to the negative control.

466

467 **Multiplex Cytokine Quantification**

468 Conditioned media were collected from mdMSC cultured for 24 h in poor medium (without FBS), with
469 or without IFN- γ stimulation (20 ng/mL). Supernatants were clarified by centrifugation at 400 $\times$ g for 5
470 min and stored at -80°C until analysis.

471 Cytokine concentrations were measured using the Human XL Cytokine Luminex® Performance Assay
472 46-plex Fixed Panel (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), following the manufacturer's
473 protocol. Plates were read on a Luminex® 200 system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA), and data
474 were analyzed with xPONENT software (v4.2). Cytokine levels were calculated from standard curves,
475 and all samples were run in triplicate.

476

477 **Anti-fibrotic assay**

478 Human cardiac fibroblasts (HCF, Promocell, passages 1–5) are cultured in Fibroblast Growth Medium 3
479 (Promocell) supplemented with 1% antibiotic–antimycotic solution (Sigma-Aldrich) at 37°C, 5% CO₂
480 until 80% confluence. Cells are then seeded at 30,000 cells/cm² in 24-well plates and incubated for 24h.

481 The medium is replaced with a deprivation medium (DM) (DMEM high glucose, 0.5% FBS, 1%
482 antibiotic–antimycotic, 1% non-essential amino acids) for 24 h. Next, cells are stimulated for 24h in a
483 stimulation medium (DM, 100 μ M L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 ng/mL TGF- β 1, 100 μ g/mL dextran
484 sulfate). In parallel, mdMSC are seeded at 100,000 or 300,000 cells/well in 6.5 mm Transwell® inserts
485 (0.4 μ m pores, Corning) using MesenCult™ medium (StemCell) supplemented with 1% antibiotic–
486 antimycotic, and incubated for 24h. After stimulation, HCF and mdMSC cultures are rinsed with
487 deprivation medium, and Transwells are placed into the HCF wells (stimulated+mdMSC) for 24 h of
488 indirect coculture at 37°C. Finally, Transwells are removed and HCF are either fixed for
489 immunofluorescence or collected after trypsinization and stored at -80°C for qPCR analysis.

490

491 **Immunofluorescence**

492 HCF are fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min at 37°C, then washed with cold PBS.
493 Permeabilization and blocking are performed for 1 h at 37°C in PBS containing 10% FBS and 0.2% Triton
494 X-100. Cells are incubated overnight at 4°C with anti- α -SMA primary antibody (clone 1A4, Sigma-
495 Aldrich), then for 1h at room temperature with Alexa Fluor™ 488-conjugated secondary antibody
496 (ThermoFisher) and CellMask™ Deep Red. Nuclei are stained with DAPI for 3 min. Images are acquired
497 using a Leica DM6000 inverted microscope and analyzed with ImageJ.

498

499 **RNA extraction, RT-PCR and PCR**

500 Total RNA is extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) and quantified with a
501 NanoDrop™ One spectrophotometer (ThermoFisher). cDNA is synthesized using the QuantiTect
502 Reverse Transcription Kit (Qiagen). qPCR is performed in 96-well plates using SYBR® Green reagents
503 (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) on a StepOnePlus thermal cycler (ThermoFisher). GAPDH is
504 used as the housekeeping gene. Primers are designed with Oligo 7 software; sequences and annealing
505 temperatures are provided below. Results are normalized to the negative control (stimulated).

Species	Gene	F/R	Sequence (5' to 3')	Hybridization temperature	Role
Human	COL1A1	Forward	GCACCTGCCGTGACCTCAAGAT	64,2°C	Fibrosis
		Reverse	TGGCCGCCATACTCGAACTGGAAT		
	COL3A1	Forward	ATCAGGCCAGTGGAATGTAAAGA	59,8°C	Fibrosis
		Reverse	TCACAGCCTTGCGTGTTCGATAT		
	FN1	Forward	TCCCATTATGCCGTTGGAGATGAG	59,8°C	Fibrosis
		Reverse	TCATCTGGCCATTTTCTCCCTGAC		
	GAPDH	Forward	ATGGGGAAGGTGAAGTCCGAG	60°C	Housekeeping gene
		Reverse	TCGCCCCACTTGATTTTCAGG		
	MMP2	Forward	GCGAGTGGATGCCGCTTAACTG	61,5°C	Matrix degradation / Cardiac remodeling
		Reverse	GTCCACGACGGCATCCAGGTTATC		
	POSTN	Forward	GGAGAAACGGTCCGATTACATAT	59,4°C	Cardiac remodeling
		Reverse	AGAGCATTTTGTCCCGTATCAGA		

Table 1 : List of human primers for qPCR

Anti-inflammatory assay

mdMSC are seeded at 300,000 cells/well in 6.5 mm Transwell® inserts (0.4 µm pores, Corning) with MesenCult™ medium (StemCell), 10% FBS, and 1% antibiotics, and incubated for 24h at 37°C, 5% CO₂. The next day, THP-1 monocytes are seeded at 100,000 cells/cm² in RPMI 1640 complete medium (10% FBS, 1% PSA) and stimulated with 1 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS), except for the untreated control. Transwells containing mdMSC are rinsed and transferred into THP-1 wells (stimulated+mdMSC) for 24h of indirect co-culture. Supernatants are collected, centrifuged, aliquoted, and stored at -80°C. TNFα and IL-10 levels are measured by ELISA (Biotechne, MN, États-Unis) according to the manufacturer's protocol, and optical density is read at 450/570 nm.

Transcriptomic analysis of hearts

Total RNA is extracted from cardiac tissue using TRIzol™ (Invitrogen, Waltham, MA, États-Unis) following the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity are measured with a NanoDrop™ One spectrophotometer (ThermoFisher), and reverse transcription is performed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Gene expression related to fibrosis, apoptosis, and heart failure is analyzed using the same RT-qPCR protocol described in the "RNA extraction, RT-PCR and PCR" section.

525 Primer sequences and annealing temperatures are listed in the table below. Results are normalized to
 526 the sham group.

Species	Gene	F/R	Sequence (5' to 3')	Hybridization temperature	Role
Rat	Col1a1	Forward	AGCATGTCTGGTTGGAGAG	60°C	Fibrosis
		Reverse	GTGATAGGTGATGTTCTGGGAG		
	Col3a1	Forward	GTGAACATGGCCCTCCAG	60°C	Fibrosis
		Reverse	CCTCTTCTCCTTTAGCACCTG		
	Cxc19	Forward	CAAACCTGCCTAGACCCAGATTCA	59,6°C	Inflammation
		Reverse	GACTCCGGATGGTGGGGGTTTTA		
	Cxc11	Forward	ACGGTTCAGGCTTCGTTATGTTTC	59,6°C	Inflammation
		Reverse	GGTCCAGGCACCTTTGCCTTTAT		
	Ddah1	Forward	GCTGGCCCAACCTGATCGCAATA	62,2°C	Cardiac function
		Reverse	CGTCCGGTACAGTGAGCTTGTCAT		
	Errfi1	Forward	GCCGTTTCTGGACCATGTTATCTA	60,1°C	Apoptosis
		Reverse	CACCCACGATAACTCTCAATCAT		
	Fn1	Forward	GGTACCACTGGCCACACCTACAAC	59,6°C	Fibrosis
		Reverse	GCACGTCCAACGGCATGAAGCATT		
	Gapdh	Forward	GGGCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCT	63,7°C	Housekeeping gene
		Reverse	TCACAAGAGAAGGCAGCCCTGGTA		
	Ly6c	Forward	TGTGCAGAAAGAGCTCAGGGCTTA	60°C	Inflammation
		Reverse	ACAGAGCCCTCTACAGCTTCTAAC		
	Nppb	Forward	CGGGCTGAGGTTGTTTAGGAAGA	59,2°C	Heart failure
		Reverse	GGCAAGTTTGTGCTGGAAGATAAG		
	Plod2	Forward	TCCGGCCTCACACGATGCGTCAA	62,5°C	Fibrosis
		Reverse	CGGGGGGATTTCGATGGAGCAATTA		
	Postn	Forward	ATAGACGGGGTTCCTGTTGAAATA	59,2°C	Cardiac remodeling
		Reverse	TGATCGCCTTCTAGACCCTTGAAC		
	Ptgs2	Forward	TCTGGTGCCGGTCTGATGATGTA	62,5°C	Inflammation
		Reverse	CGCTCAGGTGTTGCACGTAGTCTT		
	Thbs1	Forward	TACCAGTCCAGCAGCCGCTTCTAC	62,8°C	Cardiac remodeling
		Reverse	CGGGGCCAGTGGTGAGTTACAA		

528 Table 2 : List of rat primers for qPCR

530 Acknowledgements

531 The authors would like to thank Gilles Renaud and Franck Lager from the Institut Cochin Life Imaging
 532 Platform for their assistance with the analysis of echocardiographic data.

534 AI Authorship

535 The authors declare that they have not use AI-generated work in this manuscript.

536

537 *Availability of data and materials*

538 The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the
539 corresponding authors.

540

541 *Funding*

542 This project was funded under the “Conventions Industrielles de Formation par la REcherche” (CIFRE)
543 program, with the support of the company Poietis.

544

545 **Author’s information**

546 *Authors and Affiliations*

547 Rose Guesdon : Inserm UMR 970, PARCC, Université Paris Cité, Paris, France / Poietis, Pessac, France

548 rose.guesdon@inserm.fr

549 Serena Santoro : Inserm UMR 970, PARCC, Université Paris Cité, Paris, France

550 Serena.santoro@inserm.fr

551 Audrey Cras : Inserm UMR 1342, Centre d'investigation Clinique de Biothérapies CBT501, Paris, France.

552 audrey.cras@aphp.fr

553 Etienne Pagin : Poietis, Pessac, France.

554 etienne.pagin@poietis.com

555 Didier Serteyn and Justine Ceusters: Université de Liège, Centre de l’oxygène R&D, Sart-Tilman, Belgium

556 Didier.serteyn@uliege.be

557 J.ceusters@uliege.be

558 Fabien Guillemot : Poietis, Pessac, France.

559 fabien.guillemot@poietis.com

560 Albert Hagege : Service de Cardiologie, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.

561 albert.hagege@aphp.fr

562 Philippe Menasché : Inserm UMR 970, PARCC, Université Paris Cité, Paris, France / Service de Chirurgie

563 Cardiovasculaire, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.

564 philippe.menasche@aphp.fr

565

566 *Contributions*

567 R.G. and P.M designed the protocol analyzed data, and drafted the manuscript.

568 R.G., S.S., A.C. and E.P. conducted experiments and acquired data.

569 D.S. and J.C. developed the microbiopsy harvest procedure and took care of mdMSC collection and

570 production.

571 A.H. assessed and validated the echocardiographic data.

572 F.G. provided scientific advice and reviewed the manuscript.

573 All the authors contributed to the final manuscript

574

575 *Corresponding authors*

576 Rose Guesdon, email : rose.guesdon@inserm.fr

577 Philippe Menasché , email : philippe.menasche@aphp.fr

578

579 **Ethics declarations**

580 *Ethics approval*

581 **Human cells**

582 The mdMSC were obtained from the company REVATIS following the establishment of a Material

583 Transfer Agreement. Human samples are derived from healthy volunteer donors who provided an

584 informed consent . All experiments are approved by the Regional Ethical Research Committee of the
585 Bordet Institute and conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki
586 (4).

587 The T-cells were obtained from PBMC in AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Unité de Thérapie Cellulaire. All
588 samples collected from healthy adult donors were obtained after a written and informed consent,
589 following the Helsinki's Declaration and in compliance with the regulation of the Health Authorities.
590 Approval was obtained from the Comité de Protection des Personnes (Ethics Committee) Ile de France
591 IV (IRB00003835) (28).

592 The iPSC-MSC (iCell Mesenchymal Stem Cells Kit, 01279 #R1098) were purchased from FUJIFILM
593 Cellular Dynamics, Inc. (FCDI). The original iPSC lines were sourced from the CIRM iPSC Repository,
594 which contains samples from 2,500 donors. All tissue collection and informed consent procedures were
595 conducted in accordance with CIRM guidelines and approved by Institutional Review Boards.

596 The Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC, #C-12200) and Human Cardiac Fibroblasts (HCF,
597 #C-12375) were purchased from PromoCell and obtained from donors who have signed an informed
598 consent form detailing the purpose of the donation and the tissue processing procedure.

599

600 **Animal use**

601 All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee from the Université de Paris
602 (Project APAFIS#25824) on the 19/08/2020 and comply with the ARRIVE guidelines 2.0 and with the
603 European legislation (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments). All procedures followed
604 approved ethical guidelines and institutional policies. The project title is : "Évaluation des vésicules
605 extracellulaires dérivées de cellules souches d'origine humaine comme une alternative à la greffe des
606 cellules : applications à la réparation myocardique dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique
607 avec validation du biomatériau chez le rat." For this paper, we have only used the stem cell component
608 of the application (and not the extracellular vesicles).

609

610 *Experimental Model*

611 Seven-week-old male immunocompetent Wistar rats (approximately 200 g) were obtained from Janvier
612 Labs. They were housed in our animal facility under specific pathogen-free conditions, with free access
613 to food and water, and maintained on a 12-hour light/12-hour dark cycle. Rats were housed three per
614 cage initially, and reduced to two per cage once they exceeded 300 g. Each cage was equipped with
615 environmental enrichment items, including wooden chew blocks, shelters, and nesting substrates. In
616 this study, the experimental unit is the individual animal, as n corresponds to the number of animals
617 used.

618 The required sample size was calculated based on a two-sided test with a significance level (α) of 0.05
619 and a statistical power ($1-\beta$) of 0.80, assuming a standard deviation (σ) of 10. Using the formula :

620
$$n = \frac{2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2}{\Delta^2}$$

621 where $\Delta = 13$ is the minimal biologically significant difference in LV ejection fraction to detect, $Z_{\alpha/2} =$
622 1.96, and $Z_{\beta} = 0.84$, the estimated sample size per group is :

623
$$n = \frac{2 \times (1.96 + 0.84)^2 \times 10^2}{13^2} = 9.27$$

624 Therefore, at least 10 animals per group are required to reliably detect a 13-unit difference under these
625 assumptions and our sample sizes have met these numbers.

626

627 *Experimental procedures*

628 **Procedures**

629 The first procedure is performed to induce myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, thereby
630 establishing the heart failure model. A total of 70 rats were included. Twelve rats died during surgery.
631 Cardiac function was assessed by echocardiography three weeks after infarction to evaluate the
632 severity of injury. At this stage, 27 rats were excluded due to a left ventricular ejection fraction (LVEF)
633 greater than 60%, and 31 rats were included and randomly assigned to one of the following three

634 groups : sham (n = 10), patch (n = 10), or patch + mdMSC (n = 11). Randomization was performed using
635 Microsoft Excel, with the aim of ensuring a homogeneous distribution of LVEF values across the three
636 groups. The sham group, which underwent thoracotomy alone without coronary artery encircling or
637 any additional treatment, served as the control group. The treatment was administered via a re-
638 thoracotomy for patch implantation with or without cells three weeks after the index injury. An
639 hemostatic sponge (TachoSil®) was applied at the outer surface of the patch and gently pressed against
640 the myocardial tissue with a gauze dressing to allow the patch to adhere, which only took a few
641 minutes. One month after treatments, cardiac function was reassessed by echocardiography, and the
642 animals were euthanized for heart collection.

643 All echocardiographic measurements were performed in a randomized order (based on the position of
644 the cages on the rack) to avoid introducing bias into the assessments. All data were analyzed in a
645 blinded manner by an independent core laboratory, which assessed the following parameters : left
646 ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-
647 systolic volume (LVESV), and stroke volume. Data were double-checked by a senior echocardiographer
648 (A.H.).

649

650 **Anaesthesia and euthanasia**

651 All procedures were performed under inhalation anesthesia with 2.5% isoflurane. During surgical
652 procedures, rats were placed on a heating pad and provided with an ocular lubricant (LubriThal).

653 Analgesia protocol : pre-operative and post-operative buprenorphine injections (0.05 mg/kg) were
654 administered for 48 hours, and lurocaïne® was injected at the incision site at the beginning and end of
655 the procedure.

656 After the second echocardiography, all animals were euthanized using deep inhalation anesthesia with
657 5% isoflurane. The heart, which had to remain intact, i.e., still beating at the time of harvesting, was
658 collected for histological and transcriptomic analyses.

659

660 **Statistical methods**

661 Data are presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

662 Statistical analyses were conducted using Prism 10.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA,
663 USA). For both *in vitro* and *in vivo* experiments, data with a normal distribution were analyzed using
664 one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test. Non-normally distributed
665 data were assessed using the Kruskal–Wallis test for multiple comparisons. An effect size was also
666 determined using the following equation :

667
$$d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma_{pooled}}$$

668 $\bar{x}_1$: mean of group 1

669 $\bar{x}_2$: mean of group 2

670 σ_{pooled} : pooled standard deviation of the two groups, calculated using the following formula :

671
$$\sigma_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times \sigma_1^2 + (n_2 - 1) \times \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

672 n_1 : sample size of group 1

673 n_2 : sample size of group 2

674 σ_1 : standard deviation of group 1

675 σ_2 : standard deviation of group 2

676

677 **Competing interests**

678 D.S. and J.C. are scientific advisors of Revatis, a Spin Off company of the University of Liege.