

L'ACADEMIE ROMAINE

Institute de Biologie et Pathologie Cellulaire

“Nicolae Simionescu”, Bucarest

THESE DE DOCTORAT

**Etudes sur la différenciation des cellules
progénitrices en cardiomyocytes afin
d'améliorer la transplantation de cellules
cardiaques**

Directeur de doctorat
Acad. Maya Simionescu

Doctorant
Ana-Maria Rosca

2012

CONTENU

I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

I.1. Effet de l'ischémie sur les cellules musculaires cardiaques

- I.1.1. L'organisation structurale de la cellule musculaire cardiaque
- I.1.2. Métabolisme des cellules musculaires cardiaques
- I.1.3. L'ischémie myocardique
- I.1.4. Le processus pathologique de la cardiomyopathie ischémique
- I.1.5. L'apoptose des cellules musculaires cardiaques
 - I.1.5.1. La voie extrinsèque de l'apoptose des cardiomyocytes
 - I.1.5.2. La voie intrinsèque de l'apoptose des cardiomyocytes
 - I.1.5.3. Rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose des cardiomyocytes

I.2. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

- I.2.1. Structure de la moelle osseuse
- I.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses
 - I.2.2.1. Le potentiel ostéogénique
 - I.2.2.2. Potentiel adipogénique
 - I.2.2.3. Potentiel condrogène
 - I.2.2.4. La niche des cellules souches mésenchymateuses
 - I.2.2.4.1. Les constituants cellulaires
 - I.2.2.4.2. Les constituants solubles
 - I.2.2.4.3. Les constituants de la matrice extracellulaire
 - I.2.2.5. Le rôle des cellules souches mésenchymateuses à l'appui de cellules souches hématopoïétiques
 - I.2.2.6. La migration des cellules souches mésenchymateuses et la réparation tissulaire

I.3. Les mécanismes par lesquels les cellules souches mésenchymateuses contribuent à la réparation du myocarde

- I.3.1. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses après transplantation dans le myocarde après infarctus
- I.3.2. Action des facteurs paracrines libérés par les cellules souches mésenchymateuses dans le myocarde infarctisé

I.4. Cellules souches utilisées dans la thérapie cardiaque

- I.4.1. Cellules souches mésenchymateuses
- I.4.2. Cellules musculaires squelettique
- I.4.3. Cellules progénitrices de la moelle osseuse
- I.4.4. Cellules souches embryonnaires
- I.4.5. Cellules pluripotentes induites (iPS)
- I.4.6. Cellules stem cardiaque
- I.4.7. Essais cliniques

II CONTRIBUTIONS ORIGINALES

II.1. Altérations moléculaires qui induisent l'apoptose des cardiomyocytes dans l'ischémie-reperfusion

- II.1.1. Introduction et objectifs
- II.1.2. Matériels et méthodes
- II.1.3. Résultats

- II.1.3.1. Caractérisation des cardiomyocytes néonataux
- II.1.3.2. L'apoptose des cardiomyocytes induite par l'ischémie
- II.1.3.3. Modifications moléculaires des protéines Bcl-2 induites par l'ischémie-reperfusion
- II.1.3.4. Effet des antioxydants exogènes sur l'apoptose des cardiomyocytes
- II.1.3.5. Modifications des Bcl-2 protéines induites par des oxydants exogènes en CMC
- II.1.4. Conclusions et discussion

II.2. Méthodes alternatives pour l'isolement de cellules souches mésenchymateuses

II.2.1. Purification de cellules souches (sur gradient de Percoll)

- II.2.1.1. Introduction et objectifs
 - II.2.1.1. Matériels et méthodes
 - II.2.1.3. Résultats
 - II.2.1.3.1. Localisation et quantification des cellules c-kit et Sca-1 positives dans la moelle osseuse de souris
 - II.2.1.3.2. Séparation des cellules de la moelle osseuse sur gradient de Percoll
 - II.2.1.3.3. Quantification des cellules progénitrices dans les fractions obtenues après centrifugation de la moelle osseuse sur gradient discontinu de Percoll
 - II.2.1.3.4. Evaluation du potentiel clonogène des cellules progénitrices hématopoïétiques
 - II.2.1.3.5. Expression de marqueurs de cellules différenciées dans les fractions obtenu après centrifugation
 - II.2.1.4. Conclusions et discussion
- ### **II.2.2. Isolement des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse**
- II.2.2.1. Introduction et objectifs
 - II.2.2.2. Matériels et méthodes
 - II.2.2.3. Résultats et discussion
 - II.2.2.3.1. Caractérisation phénotypique des cellules
 - II.2.2.3.2. Caractérisation fonctionnelle des cellules souches mésenchymateuses
 - II.2.2.4. Conclusions

II.3. Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes

II.3.1. La différenciation in vitro de cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes

- II.3.1.1. Introduction et objectifs
 - II.3.1.2. Matériels et méthodes
 - II.3.1.3. Résultats
 - II.3.1.3.1. Caractérisation des cellules souches
 - II.3.1.3.2. L'effet de 5-azacytidine sur la multipotence des cellules souches mésenchymateuses
 - II.3.1.3.3. La capacité de 5-azacytidine à induire la différenciation miogène des cellules souches mésenchymateuses
 - II.3.1.4. Conclusions
- ### **II.3.2. L'influence de facteurs sécrétés par le myocarde sur la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses en cardiomyocytes**

II.3.2.1. Introduction et objectifs

II.3.2.2. Matériels et méthodes

II.3.2.3. Résultats

II.3.2.3.1. Capacité de différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse

II.3.2.3.2. Techniques de marquage cellulaire

II.3.2.3.3. La différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse induite par coculture avec cellules musculaires cardiaques

II.3.2.3.4. La différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse induite par coculture avec myocarde fœtale

II.3.2.4. Conclusions

II.4. Mise en évidence des facteurs avec effet paracrin sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses dans des conditions normales et hypoxiques

II.4.1. Introduction et objectifs

II.4.2. Matériels et méthodes

II.4.2. Résultats et discussion

II.4.2.1. Conditions d'induire l'apoptose dans les cellules du muscle cardiaque

II.4.2.2. La résistance des cellules souches mésenchymateuses à l'apoptose induite par l'ischémie

II.4.2.3. L'effet des facteurs anti-apoptotiques libérés par les cellules souches mésenchymateuses sur les cardiomyocytes

II.4.2.4. Identification des facteurs avec action cardioprotectrice sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses cultivées en conditions normales et hypoxiques

II.4.4. Conclusions

III. Résumé de thèse et conclusions générales

IV. Bibliographie

Les articles publiés pendant la préparation de la thèse

Financement de la recherche

MOTS-CLE

Cellules musculaires cardiaques

Apoptose

Ischemie/Reperfusion

Oxydants exogènes

Cellules stem mésenchymateuses

Différentiation adipogène

Différentiation ostéogène

Différentiation condrogène

Différentiation myogène

Hypoxie

Gradient de Percoll

Effet cardioprotecteur

Milieu conditioné

microRNA

RESUME

Introduction - état actuel des connaissances

Les myopathies ischémiques et non ischémiques conduisent à dysfonction du ventricule gauche et, éventuellement, à l'insuffisance cardiaque. Ce dernier diminue la qualité de vie et la durée de vie augmente les coûts médicaux. Tout cela rend l'insuffisance cardiaque peut être l'un des problèmes principaux de santé dans le monde (McMurray et Pfeffer, 2005). Les thérapies actuelles fournissent dans un certain degré la survie et l'amélioration des symptômes, mais elles ne sont pas capables de renverser la condition du tissu cardiaque d'un état malade à un état sain (Kuraitis *et al.*, 2011). Le développement récent du domaine de recherche des cellules souches pourrait fournir un moyen de traiter l'insuffisance cardiaque en remplaçant les tissus endommagés au tissu sain, ce qui augmenterait la qualité de vie et la survie des patients atteints de différentes cardiomyopathies.

Les cellules-souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse ont été intensivement étudiées pour leur capacité de régénération et propriétés immunomodulatrices. Des études sur des modèles animaux ont montré que la thérapie qui utilise MSC améliore la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde en diminuant l'apoptose et en produisant de facteurs angiogéniques (Tang *et al.*, 2005). Vu que la capacité de différenciation de MSC en cardiomyocytes (CMC) est très basse et ne peut pas expliquer l'effet bénéfique transitoire observé pendant les études précliniques ou cliniques de transplantation au site d'infarctus (Rose *et al.*, 2008), cet effet a été attribué aux facteurs avec action paracrine de ces cellules (Gnecchi *et al.*, 2008). Les MSC sont capables de libérer des facteurs solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) qui agissent d'une manière paracrine sur les cellules lésées du myocarde. En plus, récemment il a été montré que les MSC sont capables de communiquer avec les cellules voisines par des fragments membranaires circulaires appelés microvésicules. Ainsi, MSC peuvent sécréter diverses composantes solubles, telles que : récepteurs, facteurs de croissance, lipides biologiquement actifs et acides nucléiques (ARNm et micro-ARN) protégés contre l'environnement extracellulaire agressif (Morel *et al.*, 2004, Gatti *et al.* 2011).

Les MSC présentent un certain nombre d'avantages pour la médecine régénérative, tels que: (i) ces cellules peuvent être facilement isolées et multipliées en culture pour obtenir un nombre approprié pour la thérapie cellulaire, (ii) elles ont une faible immunogénicité, ce que les rend aptes à la transplantation allogénique (Dai *et al.*, 2005) et à cause de cela les questions éthiques

adjacentes à d'autres types de cellules-souches utilisées pour la transplantation, telles que les cellules souches embryonnaires, sont évitées (iii).

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'étudier certains aspects de l'apoptose de CMC en conditions ischémiques et la différenciation des MSC dérivées de la moelle osseuse de souris adultes en les cellules musculaires cardiaques. Ainsi, pendant toute la durée des études doctorales, les investigations ont été concentrés sur la compréhension des mécanismes par lesquels le muscle cardiaque est endommagé pendant et consécutive l'infarctus du myocarde et de trouver une méthode efficace pour sa réparation. Cette thèse est divisée en deux grandes parties: la première partie présente l'état actuel des connaissances sur le sujet de la thèse, présentée en quatre chapitres, pendant que la deuxième partie présente les contributions originales du doctorant à la connaissance scientifique internationale, qui ont été également organisées en quatre chapitres.

I. Altérations moléculaires conduisant à l'apoptose des cardiomyocytes pendant l'ischémie-reperfusion

À travers du premier chapitre on a essayé de répondre à la question : si l'ischémie ou la reperfusion soit responsable pour l'induction de l'apoptose dans les CMC. La connaissance du stimulus principal responsable de l'induction de l'apoptose dans les CMC est nécessaire afin de trouver un traitement pour ralentir la progression de l'insuffisance cardiaque due à la perte du myocarde contractile. Ainsi, l'objectif de cette première étude a été de déterminer la contribution individuelle de l'ischémie, de la reperfusion et des oxydants exogènes à l'induction de l'apoptose dans la CMC, en établissant la contribution majeure à la progression de l'insuffisance cardiaque dans La première partie des contributions originales a été axée sur l'identification du stimulus principal responsable de l'initialisation de l'apoptose dans le myocarde. Cette information est cruciale pour le développement de thérapies pour la progression de l'insuffisance cardiaque due à la perte de contractilité du myocarde. Les résultats obtenus dans cette première phase du stage de doctorat ont indiqué que le principal inducteur de l'apoptose dans l'ischémie / reperfusion a été la reperfusion plutôt que l'ischémie *per se*. L'étude a montré que les oxydants exogènes apportés de l'environnement lors de la reperfusion sont les principaux déterminants de l'apoptose des CMC. 25-hydroxycholestérol, une composante du LDL oxydé, favorise l'apoptose des CMC par un mécanisme dépendant de la caspase-3, ce qui implique l'augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Figure 1), régulée au niveau transcriptionnel, en même temps que

la dégradation post-traductionnelle de la protéine -anti-apoptotique Bcl-2 (figure 2). L'altération de la balance des protéines pro- et anti-apoptotiques a créé des conditions favorables pour lancer le processus d'apoptose, ce qui peut avoir lieu seulement pendant la reperfusion, quand les réserves d'ATP et de glucose sont restaurées. Les résultats de cette étude indiquent que la thérapie antioxydante pourrait jouer un rôle important pour sauver le myocarde viable après un infarctus en empêchant la perte de CMC par mort cellulaire programmée.

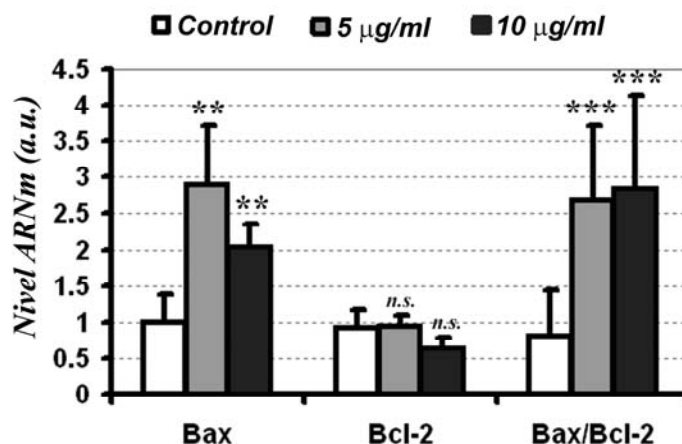


Figure 1: Les changements induits dans l'expression génique des protéines pro- et anti-apoptotiques Bax et Bcl-2 dans les CMC, après 72 heures de traitement avec 25-hydrocholesterole.

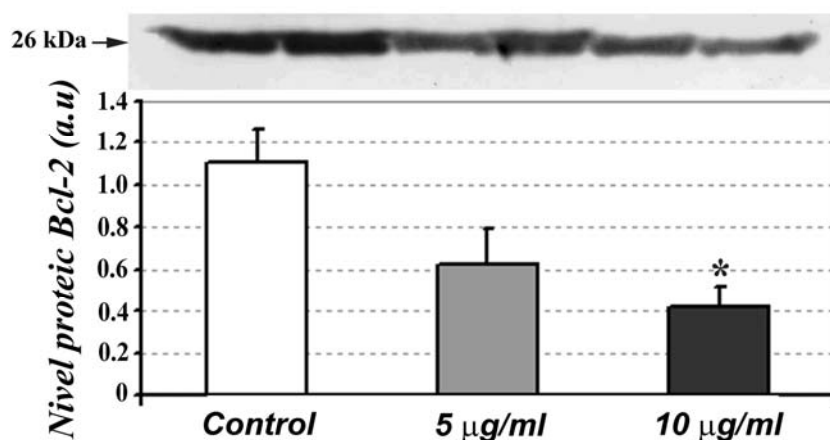


Figure 2: Quantification par Western blot des niveaux d'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement par 25-hydrocholesterol.

II. Isolement des cellules souches mésenchymateuses

L'étape suivante a consisté au développement des méthodes d'obtenir des MSC de la moelle osseuse de souris adultes, devant servir à utiliser dans des études de différenciation vers CMC. Cette phase des études doctorales a présenté un intérêt particulier parce que les MSC provenant de la souris sont plus difficiles à isoler et à propager *in vitro* que les cellules humaines ou de rat, à cause de la contamination avec des cellules hématopoïétiques. Pour cette raison, obtenir un MSC cultures à partir de la moelle osseuse de la souris était un défi qui a abouti à l'isolement de ces cellules simultanément par deux méthodes. La culture pure des MSC obtenue a ensuite été caractérisée comme suggéré par la Société internationale de Transplantation Cellulaire.

II.1. L'isolement des cellules souches mésenchymateuses par centrifugation sur gradient de Percoll

Les résultats obtenus ont montré que la centrifugation de la suspension cellulaire provenant de la moelle osseuse sur un gradient discontinu de Percoll entraîne la séparation des cellules en six fractions correspondant aux densités 1,050 1,057, 1,067, 1,070, 1,076, 1,083 et g / ml (figure 3).

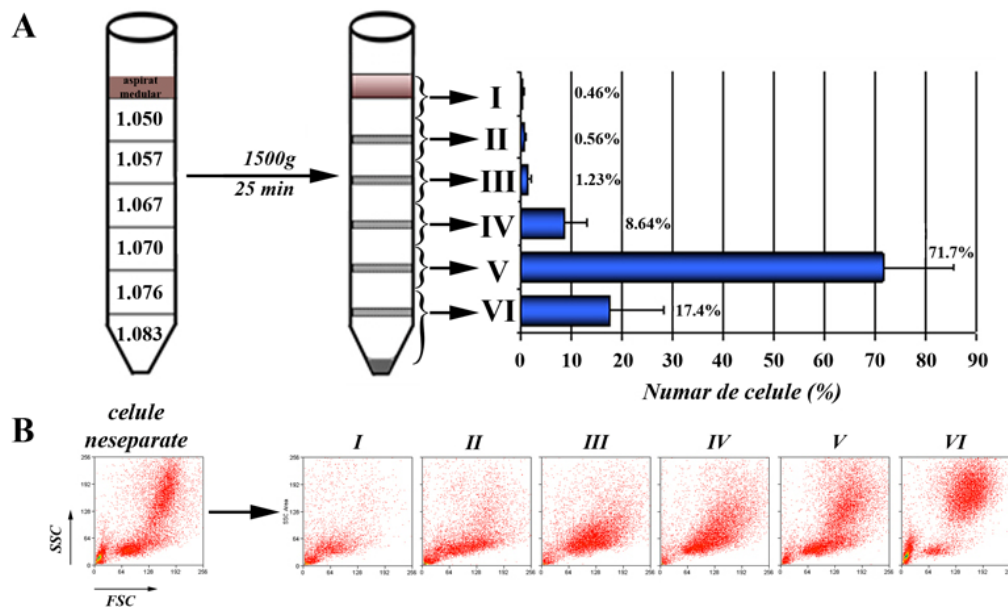


Figure 3: La séparation des cellules de la moelle osseuse en six fractions par centrifugation sur un gradient discontinu de Percoll. (A) Représentation schématique du gradient discontinu de Percoll utilisé pour le fractionnement des cellules et pourcentages correspondants à chaque fraction récupérée après centrifugation. (B) Histogramme de cytométrie de flux

montrant l'hétérogénéité des cellules avant la séparation et la morphologie des cellules dans chaque fraction.

Les cellules progénitrices, caractérisées par l'expression de marqueurs Sca-1 et c-kit ont été trouvés dans les fractions III-V. La fraction IVe a été considérée comme d'intérêt grâce à son contenu d'environ 2×10^6 cellules souches à partir d'un total de 4.3×10^6 cellules (figure 4).

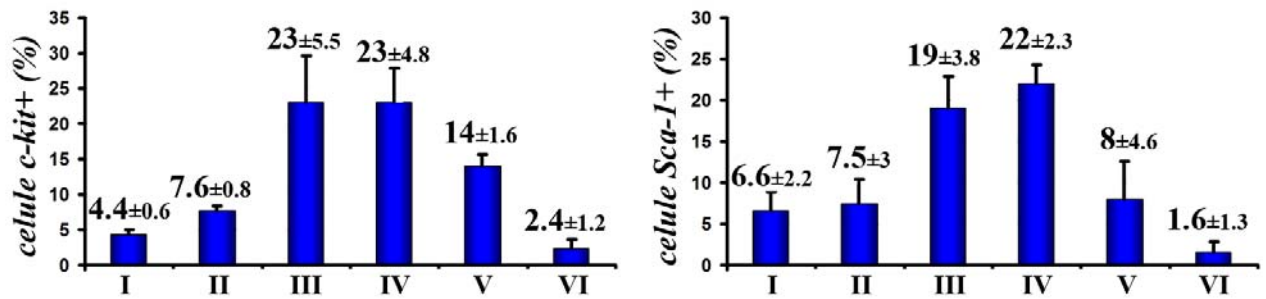


Figure 4: Représentation graphique de la moyenne des pourcentages des cellules c-kit⁺ et Sca-1⁺ correspondant à chaque fraction cellulaire, calculée à partir des résultats de trois expériences différentes.

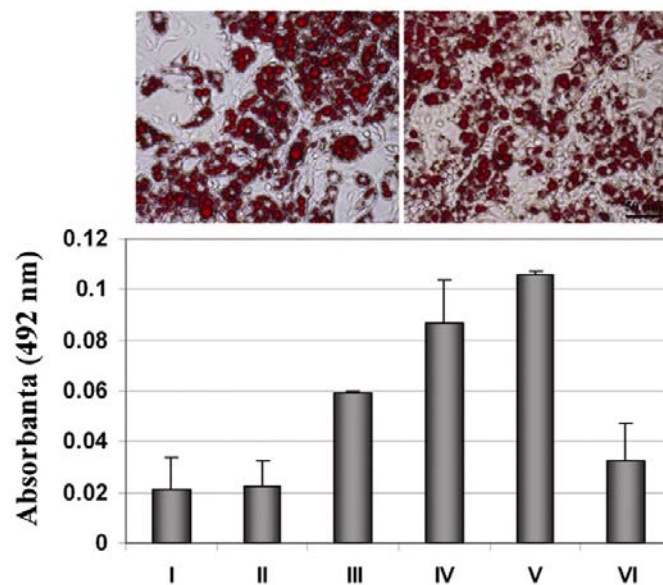


Figure 5: Quantification spectrophotométrique de l'accumulation de lipides dans les six fractions après cultiver les cellules dans un milieu de différenciation adipogénique. En haut se trouvent des images représentatives de fractions III et IV colorées avec Oil Red. La V fraction, bien qu'elle présente une accumulation massive de lipides, n'est pas enrichie de cellules souches, la coloration étant probablement due à la présence des pré-adipocytes à ce niveau.

Bien que la composition cellulaire de cette fraction ait été hétérogène, elle a compris, outre des cellules c-kit et Sca-1 positive, aussi des cellules endothéliales, qui pourraient jouer un rôle important dans le rétablissement du myocarde endommagé après un infarctus, en contribuant à la revascularisation du tissu par l'angiogenèse. En culture, cette fraction a généré des cellules $CD45^-/c\text{-kit}^-/Sca\text{-1}^+ / PECAM^-/VEGFR2^-/osteocalcine^-/colagen\ II$, qui ont généré des adipocytes et des ostéoblastes par incubation dans milieux de différenciation spécifique, en montrant la nature multipotente de ces cellules (figures 5 et 6).

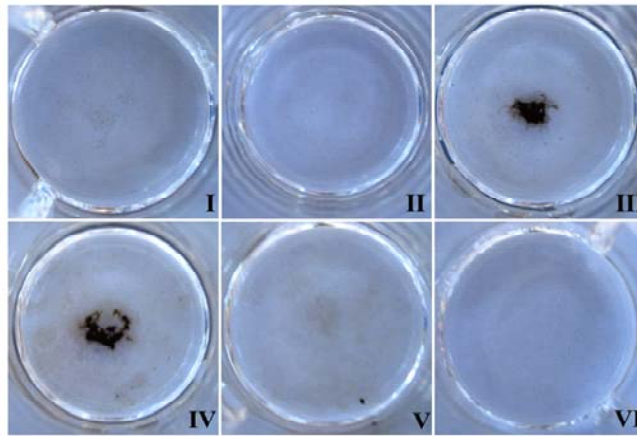


Figure 6: Image en microscopie optique représentant la coloration von Kossa des cellules adhérentes correspondant aux six fractions après deux semaines de culture en milieu de différenciation ostéogénique. On peut observer que les fractions III et IV, mais pas fraction V (qui contient la majorité des cellules) ont été en mesure de générer des ostéoblastes dans des conditions de culture spécifiques.

II.2. L'isolement de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse hématogène

En parallèle avec la méthode présentée ci-dessus, on a ainsi obtenu une population de cellules souches mésenchymateuses à partir de la de moelle osseuse hématogène par maintenir les cellules adhérentes en culture pendant une période plus longue, d'environ huit semaines. Les cellules dérivées ont formé une culture homogène qui présentait une apparence fibroblast-like et un fort potentiel de prolifération. La caractérisation de cette culture par RT-PCR (figure 7a) a

montré une expression de marqueurs de cellules souches Sca-1 et CD105 (endogline), et l'absence de marqueur c-kit, qui a indiqué une déplétion des cellules souches hématopoïétiques. Une autre caractéristique de ces cellules a été la présence de filaments intermédiaires de vimentine et de nestine. L'expression de ces protéines (figure 7b) a suggéré un rôle possible dans la régénération des tissus vue que la présence de filaments de nestine soit spécifique des cellules jeunes ayant une capacité migratoire.

La caractérisation de ces cellules a été complétée par des études de différenciation en plusieurs types de cellules, comme les adipocytes, ostéoblastes et les chondrocytes. Cela a montré leur caractère multipotent qui a été maintenu inchangé pendant plusieurs passages (figure 8). Cette culture a été utilisée dans des études ultérieures qui ont suivi la différenciation dans un phénotype musculaire, dont les résultats sont présentés au chapitre III de cette thèse.

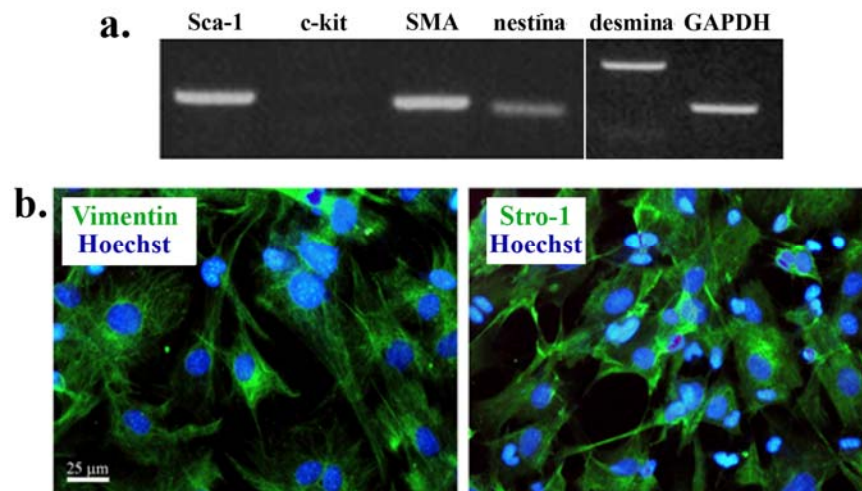


Figure 7: (a) RT-PCR montrant le niveau d'expression de l' ARNm de marqueurs de MSC: Sca-1, l'actine spécifique pour les cellules musculaires lisses (SMA) et la desmine. On peut observer aussi l'absence de l'expression du marqueur de cellules souches hématopoïétiques c-kit (b) Image d' immunocytochimie qui montre la présence des filaments intermédiaires de vimentine et l'expression du marqueur des cellules stromales Stro-1 dans toutes les cellules en culture.

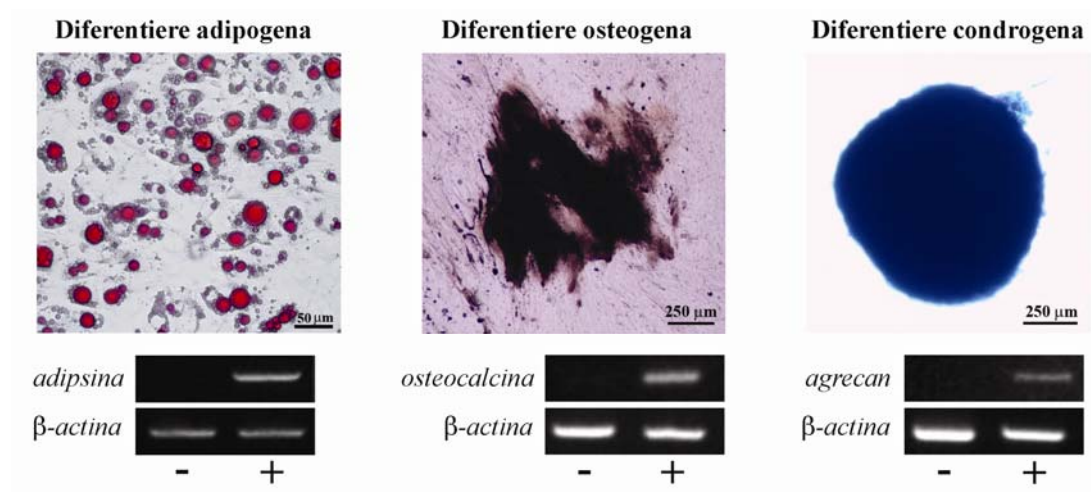


Figure 8: Caractérisation du caractère multipotent des MSC. Sur le côté gauche de l'image on peut observer la différenciation des cellules en adipocytes, mise en évidence par coloration des accumulations de lipides intracytoplasmiques avec Oil Red O et la détermination de l'expression génique de l'adipsine par RT-PCR. Au centre de l'image la différenciation de cellules dans ostéoblastes est présentée. En haut il se voit la coloration von Kossa et ci-dessous l'expression d'ostéocalcine (RT-PCR) est illustré. Sur la droite la coloration au Bleu Alcian des mucopolysaccharides acides cellules spécifiques pour les chondrocytes différenciés et l'expression génique du protéoglycane agrecan dans sont présentés.

III. La différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cardiomyocytes

Pour induire la différenciation MSC vers un phénotype cardiaque 5-azacytidine, un composé agissant déméthylation du matériel génétique, connu pour sa capacité à améliorer la différenciation des cellules souches embryonnaires à CMC, a été utilisé.

L'action de la 5-azacytidine sur la propriété des cellules souches de se différencier en lignées cellulaires multiples a été un point d'intérêt de cette thèse. Les résultats ont montré que les cellules traitées avec 5-azacytidine et ont progressivement perdu leur capacité à se différencier en adipocytes et ostéoblastes quand ils ont été incubés dans des conditions de différenciation spécifiques. L'augmentation du potentiel de différenciation des MSC dans chondrocytes après traitement avec 5-azacytidine a été un résultat inattendu. La conclusion de cette étude a été : les MSC conservent leur propriété de différenciation après la première exposition à l'action de la 5-azacytidine, mais elle est progressivement réduite à chaque exposition, en augmentant la capacité de générer des chondrocytes (figure 9).

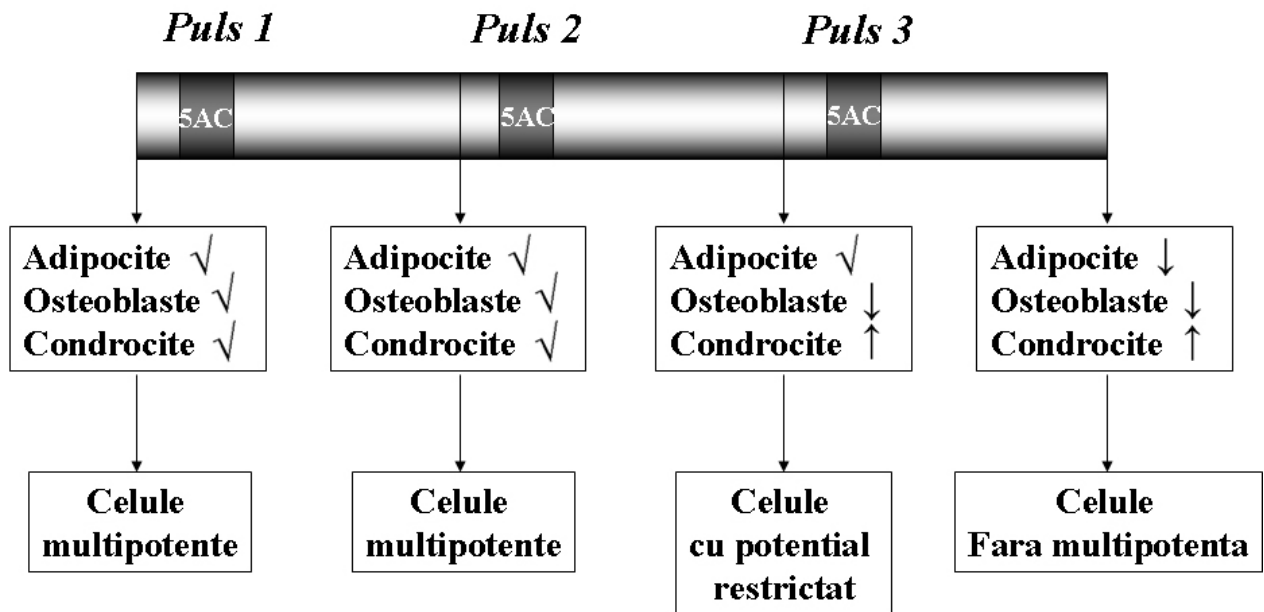


Figure 9: L'effet du traitement avec 5-azacytidine sur la capacité des MSC de différenciation en lignes cellulaires multiples. Cette propriété est devenue plus restrictive après exposition au 5-azacytidine. Après 2 ou 3 traitements avec 5-azacytidine, la capacité de se différencier en chondrocytes a été augmenté de manière significative.

Avec soulignant les modifications du caractère pluripotent des MSC par traitement avec la 5-azacytidine, on a poursuivi la capacité de cet agent chimique à induire la différenciation de ces cellules vers un phénotype musculaire cardiaque. Les figures 10 et 11 montrent que, sauf pour quelques gènes musculaires spécifiques (α -actine cardiaque, canal de calcium du type L), l'expression d'aucune des gènes impliqués dans la différenciation des cellules musculaires cardiaques n'a pas été induite dans les cellules traitées. Cependant, 5-azacytidine a induit l'expression des gènes spécifiques du muscle squelettique, ce qui a permis la différenciation des MSC en myoblasts quand incubées en conditions myogènes spécifiques (figure 12). En conclusion, le traitement avec 5-azacytidine pourrait favoriser la différenciation des MSC en cellules cardiaques, à condition de déterminer les facteurs spécifiques qui pourraient affecter la réalisation de la différenciation en CMC matures et fonctionnelles.

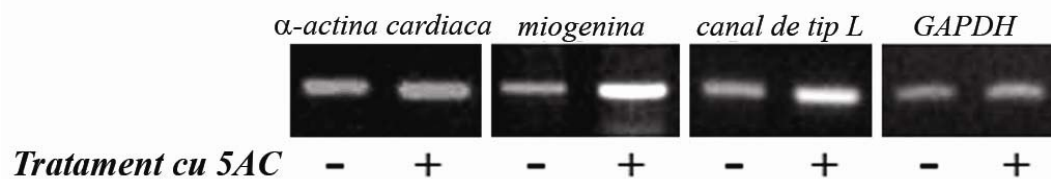


Figure 10: RT-PCR montrant l'expression augmentée des gènes musculaires spécifiques après le traitement avec 5-azacytidine.

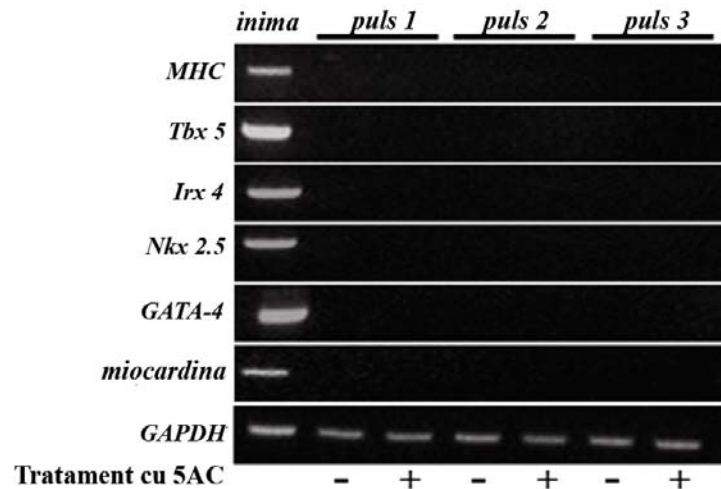


Figure 11: RT-PCR qui montre l'absence de l'expression des facteurs de transcription et d'autres gènes spécifiques du myocarde après le traitement avec 5-azacitidine.

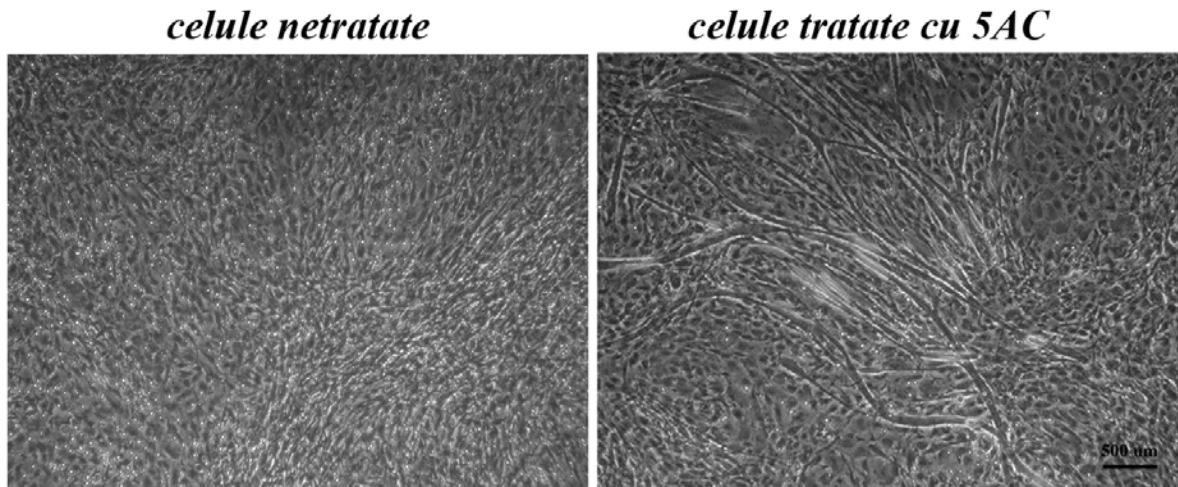


Figure 12: Image de microscopie à contraste de phase qui montre les myotubes formés dans les cultures de MSC traités par 5-azacytidine après privation de sérum.

Suite à ces observations, nous avons constaté que le traitement avec 5-azacitidine associée à un contact direct avec les cellules du myocarde peut avoir un effet bénéfique sur la différenciation des cellules stromales en CMC. Ainsi, nous avons suivi les changements dans les cellules stromales de la moelle par contact direct avec les cellules musculaires cardiaques. Les résultats montrent qu'en effet, la cummulation des deux facteurs induisant la différentiation conduit à l'initiation de l'expression des facteurs de transcription cardiaques spécifiques, tels GATA-4 et Nkx2.5 (figure 13), dans les cellules stromales de la moelle osseuse de souris. En plus, l'expression de l-actinine, un indicateur de la différenciation vers un phénotype de muscle strié a été observée.

De plus, les résultats des expériences de coculture dans chambre double, un système qui permet le passage des molécules par les pores d'une membrane semipermeable, ont montré que les facteurs solubles libérés par le myocarde ischémié cumulent avec le traitement avec 5-azacytidine conduit l'augmentation du processus de différenciation des cellules de la moelle osseuse vers un phénotype cardiaque. Ainsi, l'accumulation de l'exposition au 5-azacytidine et de l'action des signaux provenant du myocarde ischémié entraînent l'initiation de la transcription des principaux facteurs impliqués dans la différenciation des cellules musculaires cardiaques tels que: l'actine musculaire, l'actinine, desmine, GATA-4, Nkx2.5 et des canaux de calcium de type L (figure 14). Ainsi, on peut conclure que l'initiation de la différenciation induite par la déméthylation de certains gènes est aidée par l'effet de facteurs solubles cardiaques qui sont en mesure d'achever ce processus.

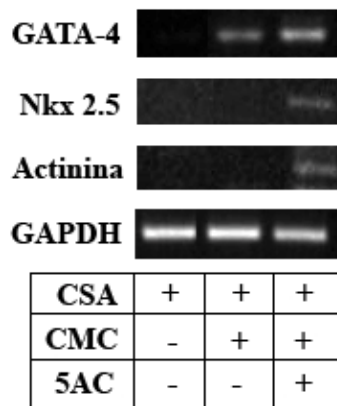


Figure 13: RT-PCR montrant l'induction de l'expression génique des marqueurs cardiaques dans les cellules traitées avec 5-azacytidine après 1 semaine en culture avec CMC fœtales. On peut observer que l'effet cumulatif de ces deux conditions (traitement avec 5-azacytidine et contact direct entre les cellules stromales et CMC) est supérieur au simple contact entre les deux types cellulaires.

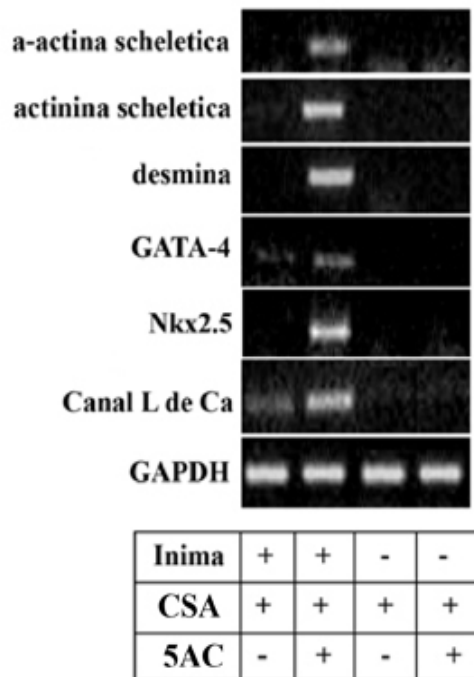


Figure 14: RT-PCR montrant l'induction de l'expression génique des marqueurs des cellules musculaires cardiaques dû à l'effet cumulatif des facteurs induisant la différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse dans CMC: 5-azacytidine et facteurs sécrétés par le myocarde ischémiq.

IV. Mise en évidence des facteurs paracrins sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses en conditions normales et hypoxique

Le dernier chapitre de cette thèse a été réalisé dû aux rapports récents de la littérature sur les résultats d'essais cliniques. Ils ont montré que les effets bénéfiques de la greffe de cellules souches dans l'infarctus du myocarde sont transitoires, ce qui suggère un effet paracrin exercé par les cellules transplantées par l'intermédiaire des facteurs angiogéniques et cardioprotecteurs sécrétés. Ainsi, la dernière partie de cette thèse comprit l'étude de l'effet anti-apoptotique de facteurs solubles libérés par MSC sur les cellules musculaires cardiaque et l'identification des facteurs cardioprotecteurs sécrétés par les MSC en conditions normales et hypoxiques. Une observation particulièrement importante observée à partir de ces expériences a été la capacité des MSC de s'adapter et survivre en conditions hypoxiques, montrée par la résistance de ces cellules à l'apoptose induite par la hypoxie (Figure 15).

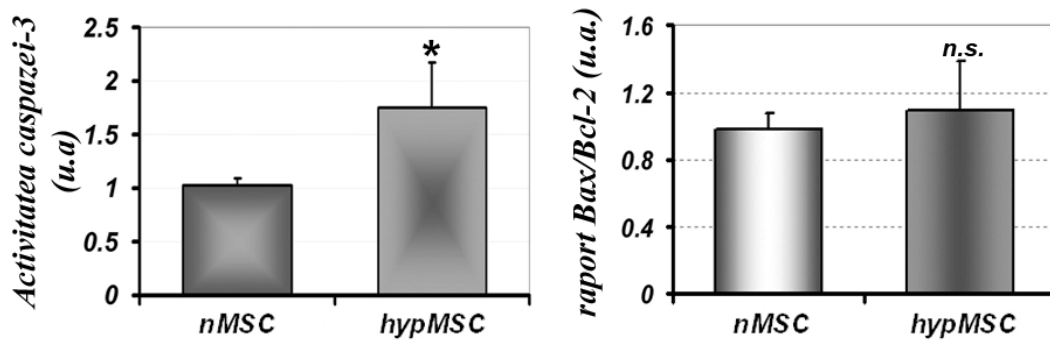


Figure 15: Illustration de la résistance des MSC en conditions ischémiques: le graphique de gauche montre une légère augmentation de l'activité de la caspase-3, tandis que le ratio de l'expression du gène pro-apoptotique Bax et du gène anti-apoptotique Bcl-2, tel que déterminé par PCR quantitative, reste inchangé (graphique de droite).

La résistance des MSC à l'hypoxie induite par apoptose est particulièrement importante pour leur survie dans le myocarde ischémique, où le milieu est dépourvu d'une vascularisation adéquate pour assurer le nécessaire d'oxygène.

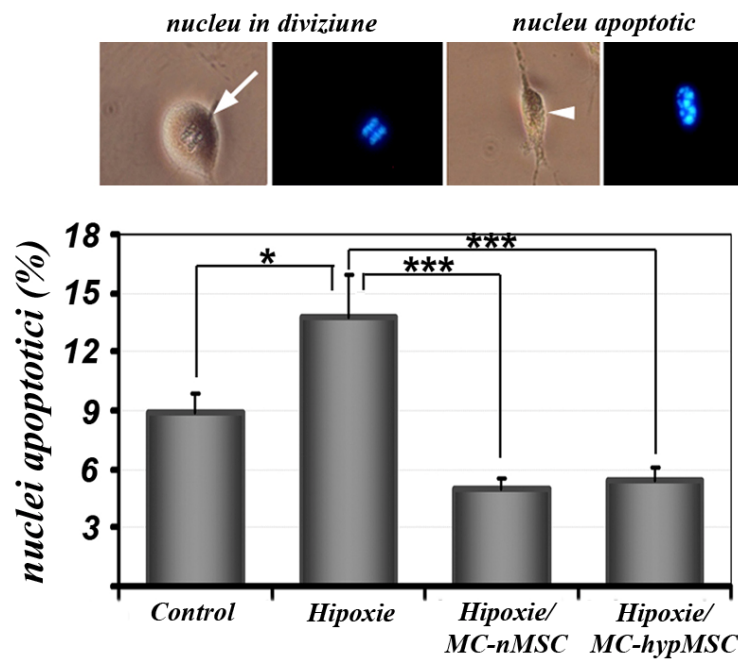


Figure 16: Détermination quantitative de l'apoptose dans les myocytes cardiaques après exposition à l'hypoxie en présence et en absence du milieu conditionné. Le tableau en bas présente les pourcentages des noyaux apoptotiques déterminées par coloration au Hoechst. Au moins 1000 noyaux ont été comptés pour chaque test (*, $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). On peut observer en haut de cette image des exemples des noyaux apoptotiques, aussi que des noyaux en division.

L'étude de l'effet du milieu conditionné des MSC sur les CMC incubées en conditions hypoxiques a montré que ces cellules sont capables de sécréter des facteurs avec action cardioprotectrice. La supplémentation du milieu des CMC incubées en conditions hypoxiques avec milieu conditionné des MSC a empêché l'induction de l'apoptose (Figure 16). Les résultats ont montré le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale, ce qui a permis d'éviter l'initiation apoptose. En plus, le milieu des MSC hypoxique a eu des effets similaires à cela récolté à partir des cellules cultivées en atmosphère normoxique (20% O₂), ce qui montre que les MSC conservent leurs propriétés cardioprotectrices pendant l'incubation en conditions hypoxiques. Ce résultat suggère que les MSC transplantées dans le myocarde hypoxique sont capables de contribuer à la survie des CMC affectées par le stress oxydatif et l'hypoxie durant la reperfusion.

L'étude de la composition du milieu conditionné des a montré que ces cellules sont capables de conserver la capacité de synthétiser et libérer certains facteurs cardioprotecteurs tels que certaines cytokines et microARN. Ainsi, on a identifié quelques cytokines sécrétées par le MSC incubés dans des conditions normales, dont quatre ont été trouvés en quantités similaires dans le MSC incubées en hypoxie: TIMP-1, MCP-1, SDF-1 α et IL1ra (Figure 17).

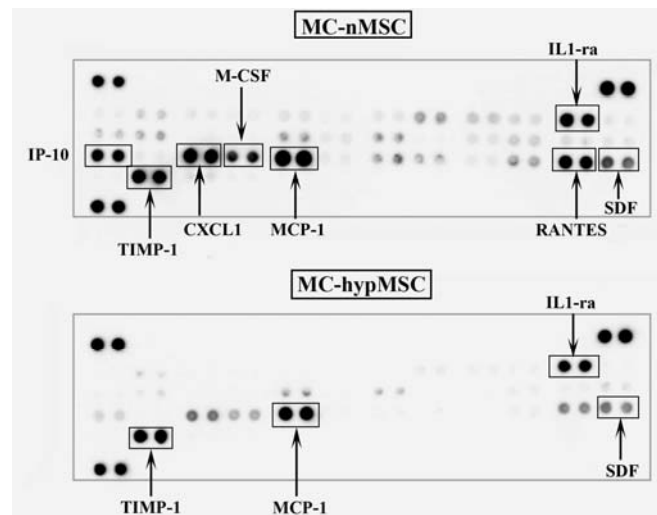


Figure 17: Identification des cytokines sécrétées par MSC en conditions normoxiques (image du haut) et hypoxiques (en bas) par la technique " cytokine array ".

Conformément à la littérature, ces facteurs pourraient être responsables, au moins partiellement, de l'effet cardioprotecteur exercé par la présence des MSC dans le myocarde ischémique, soit grâce à l'action anti-apoptotique ou à la capacité d'induire le processus d'angiogenèse, important pour rétablir l'approvisionnement du tissu d'oxygène et de nutriments.

Outre ces molécules, il semble que le transfert d'information génétique entre MSC et cellules endommagées est un mécanisme important, qui pourrait être responsable de l'effet réparateur des MSC. Ainsi, on a observé dans le milieu extracellulaire des MSC hypoxiques une augmentation de la quantité des microARN 199a et 1225b, connus pour leur effet anti-apoptotique (Figures 18 et 19).

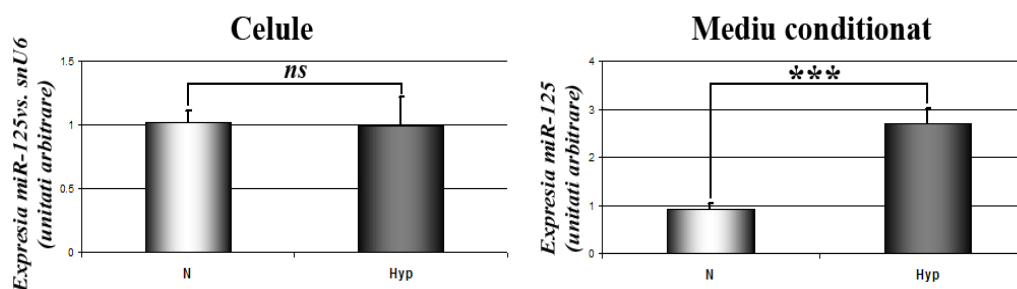


Figure 18: Quantification du microARN-125 par PCR quantitative dans les MSC incubés en conditions de normoxie et d'hypoxie (graphique de gauche) et le milieu extracellulaire récoltées à partir de cellules maintenues dans les deux conditions (***) $p < 0,0005$.

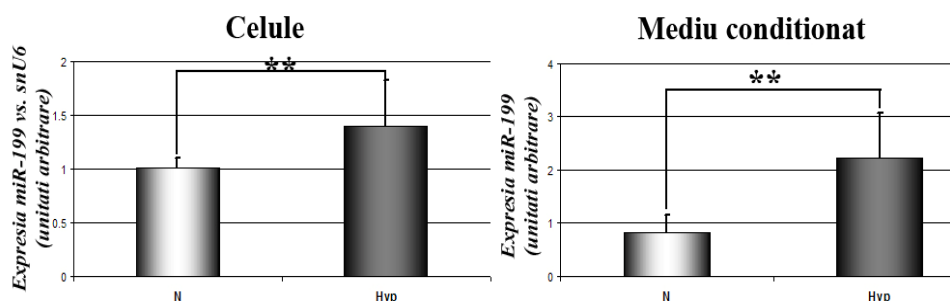


Figure 19: Quantification du microARN-199 par PCR quantitative dans les MSC incubés en conditions de normoxie et d'hypoxie (graphique de gauche) et le milieu extracellulaire récoltées à partir de cellules maintenues dans les deux conditions (** $p < 0,005$).

En conclusion, la composition du milieu extracellulaire des MSC consiste en une combinaison de facteurs avec effet soit anti-apoptotiques (TIMP-1, MCP-1, miR-199a, miR-125b), soit inhibiteurs de croissance des fibroblastes (IL1ra) ou angiogéniques (SDF-1 α). La présence de ces facteurs cardioprotecteurs dans sécrétion des MSC pourrait être responsable de l'effet anti-apoptotique sur les CMC incubées en conditions hypoxiques observé dans nos expériences.

Conclusions

L'information contenue dans cette thèse a été matérialisée dans des articles publiés en revues internationales à facteur d'impact ISI, des présentations orales ou des affiches aux réunions scientifiques nationales et internationales. Au cours de la préparation de la thèse, les résultats suivants ont été obtenus:

- On a montré que le facteur principal responsable pour l'initialisation de l'apoptose des CMC soumis à l'ischémie est représenté par les oxydants exogènes amenés par la réperfusion au site de la lésion;
- On a établi une méthode pour purifier une population de cellules progénitrices par fractionnement de la moelle osseuse par centrifugation sur gradient discontinu de Percoll ;
- On a obtenu des cultures homogènes de MSC, caractérisées conformément aux normes fixées par la Société Internationale de Transplantation Cellulaire ;
- L'effet de l'action de déméthylation de 5-azacytidine sur la nature pluripotente des MSC a été montré;
- On a démontré l'effet accru de la cumulation de 5-azacytidine et des facteurs sécrétés par le myocarde pour l'augmentation de la différenciation des MSC vers un phénotype cardiaque;
- On a démontré l'effet anti-apoptotique des facteurs libérés par MSC normale et hypoxique sur CMC;
- Des facteurs avec action anti-apoptotique, anti-fibrotique et pro-angiogénique ont été identifiés dans le milieu extracellulaire des MSC incubées en conditions normales et hypoxique ; ces facteurs pourraient être responsables de l'action cardioprotectrice de ces cellules.

Bibliographie

1. McMurray JJ. and Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet* 2005; 365: 1877-89.
2. Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011;25(4):349-62.

3. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Oct 4;46(7):1339-50.
4. Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells*. 2008;26:2884–92.
5. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res*. 2008; 103: 1204-19.
6. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 May;26(5):1474-83.
7. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr. Opin. Hematol*. 2004;11(3):156-64.
8. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 2005; 112: 214-23.