

**ACADÉMIE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE
"NICOLAE SIMIONESCU"**

THÈSE DE DOCTORAT

**LA THERAPIE AVEC DES CELLULES SOUCHES DANS
L'INFARCTUS DU MYOCARDE :
MECHANISMES ET SIGNAUX MOLECULAIRES PAR
LESQUELS LES CELLULES TRANSPLANTEES CONFERENT
CARDIOPROTECTION DANS L'ISCHEMIE**

**Coordinateur SCIENTIFIQUE
Académicien MAYA SIMIONESCU**

**DOCTORANT
MIHAI BOGDAN PREDA**

**BUCAREST
2013**

SOMMAIRE

PRÉFACE	1
ABRÉVIATIONS	2
I. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	
I.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'ischémie-reperfusion cardiaque	3
I.1.1. Infarctus aigu du myocarde	3
I.1.2. Les étapes de cicatrisation des plaies induites par l'ischémie-reperfusion cardiaque	6
I.1.3. Rôle de la matrice extracellulaire cardiaque dans le processus de réparation	6
I.1.4. La mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion	10
I.2. “Conditionnement cardiaque“ – stratégie thérapeutique contre les lésions d'ischémie-reperfusion du cœur	12
I.2.1. Conditionnement ischémique	13
I.2.2. Post conditionnement ischémique	15
I.2.3. Post conditionnement ischémique à distance	17
I.2.4. Preconditionnement ischémique	17
I.3. Les cellules souches et leur potentiel thérapeutique dans la maladie cardiaque ischémique	19
I.3.1. Histoire de la découverte des cellules souches	19
I.3.2. Les cellules souches embryonnaires	21
I.3.3. Potentiel des cellules souches embryonnaires pour générer des cardiomyocytes	25
I.3.4. Les cellules souches adultes	30
I.3.4. Les cellules souches mésenchymateuses	34
I.3.5. Potentiel des cellules souches mésenchymateuses pour générer des cardiomyocytes	38
II. CONTRIBUTIONS ORIGINALES	
II. 1. Établissement de modèle expérimental d'ischémie fémorale chez la souris	41
II.1.1 Introduction et objectifs	41

II.1.2 Matériels et méthodes	42
II.1.3 Résultats et discussion	45
II.1.4 Conclusions	47
II.2. Établissement d'un modèle expérimental de l'ischémie-reperfusion	
myocardique chez la souris	47
II.2.1. Introduction et objectifs	47
II.2.2. Matériels et méthodes	49
II.2.3. Résultats et discussion	52
II.2.4. Conclusions	56
II.3. Les changements induits par l'ischémie-reperfusion myocardique chez	
la souris	58
II.3.1. Introduction et objectifs	58
II.3.2. Matériels et méthodes	59
II.3.3. Résultats et discussion	63
II.3.4. Conclusions	66
II.4. L'effet de l'ischémie sur la fonction du cœur perfusé ex vivo en système Langendorff	
.....	68
II.4.1. Introduction et objectifs	68
II.4.2. Matériels et méthodes	69
II.4.3. Résultats et discussion	72
II.4.4. Conclusions	75
II.5. La dérivation de cellules souches embryonnaires de souris	75
II.5.1. Introduction et objectifs	75
II.5.2. Matériels et méthodes	77
II.5.3. Résultats et discussion	81
II.5.4. Conclusions	87
II.6. L'influence des conditions d'agrégation des cellules souches embryonnaires sur	
leur efficacité de générer des cardiomyocytes contractiles in vitro	88
II.6.1. Introduction et objectifs	88
II.6.2. Matériels et méthodes	89
II.6.3. Résultats et discussion	91

II.6.4. Conclusions	95
II.7. Stimulation de la régénération cardiaque par combinaison des facteurs sécrétés par les cellules souches mésenchymateuses et les cellules progéniteurs endothéliales	97
II.7.1. Introduction et objectifs	97
II.7.2. Matériels et méthodes	98
II.7.3. Résultats et discussion	103
II.7.4. Conclusions	112
II.8. La transplantation sous-cutanée des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux protège le cœur contre les lésions induite par l'ischémie-reperfusion	114
II.8.1. Introduction et objectifs	114
II.8.2. Matériels et méthodes	116
II.8.3. Résultats et discussion	120
II.8.4. Conclusions	128
III. CONCLUSIONS GÉNÉRALES	131
IV. RÉFÉRENCES	135
V. ARTICLES PUBLIÉS	168
VI. FINANCEMENT DE LA RECHERCHE	161

MOTS-CLÉS: maladies cardiovasculaires, ischémie-reperfusion cardiaque, l'artère coronaire gauche, cellules souches embryonnaires, corps embryoides, cellules souches mésenchymateuses, thérapie à distance.

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires représentent la cause principale de décès dans le monde et l'une de leurs plus importantes manifestations cliniques sont les cardiopathies ischémiques. Il s'agit d'un état pathologique du cœur caractérisé par une réduction du débit coronaire dans une certaine région du myocarde, qui se traduit par l'apparition de l'infarctus suivi par la nécrose myocardique due à l'ischémie. Le développement de l'insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde est fortement lié aux altérations de la géométrie, de la fonction et de la structure du cœur, altérations collectivement appelés "remodelage ventriculaire".

Le traitement actuel de l'insuffisance cardiaque peut seulement améliorer les symptômes mais ne peut pas inverser la perte de tissu myocardique par le remplacement des cellules mortes avec des cardiomyocytes (CMC) contractants nouvelles. A présent, la seule alternative valable pour les manifestations pathologiques les plus graves de l'insuffisance cardiaque est la transplantation cardiaque. Pourtant, cette intervention thérapeutique est limitée, non seulement par les coûts élevés, mais aussi par l'indisponibilité des donateurs.

Dans ces circonstances, la thérapie avec des cellules souches, soutenue par les résultats précliniques obtenus au cours des dernières dix années, a fait naître l'espoir dans le domaine de la cardiologie pour le traitement de l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque. Ces résultats expérimentaux ont conduit au début des premiers essais cliniques, mais leur effet jusqu'au présent est plutôt modeste, montrant une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire gauche de seulement 2-4%. En plus, certaines études ont montré qu'il n'existe pas, dans le long terme, des différences significatives entre la fonction d'un myocarde infarci aillant reçu une greffe de cellules et un sans greffe,. La raison en est que les cellules transplantées sont mal conservées dans le cœur infarci et que la plupart d'entre eux meurent après la transplantation. En conséquence, on a avancé l'hypothèse que l'amélioration cardiaque n'est pas due à la régénération du myocarde, mais aux biomolécules sécrétées par les cellules souches qui peuvent aider pour une période dans le processus de remodelage. Ces conclusions ont eu comme effet la reconsidération des observations antérieures dans le domaine des cellules souches et ont identifié la nécessité d'élaborer des nouvelles stratégies pour améliorer les taux de survie, la prise de greffe et la différenciation des cellules après la transplantation.

Les principaux types de cellules souches pour la thérapie régénérative du myocarde infarci sont les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches adultes (CSA). CSE sont générées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste avant son implantation et sont des cellules pluripotentes, capable de se différencier en cellules issues de n'importe lequel des trois feuilletts embryonnaires: ectoderme, endoderme et mésoderme. Elles peuvent être maintenues dans l'état indifférencié en culture dans des conditions spécifiques. Lorsque ces conditions sont modifiées, les cellules commencent à se différencier et il est donc possible de les manipulés pour obtenir des CMC. Toutefois, les CMC générées par les CSE ont un phénotype immature, ce qui les rend à présent inutilisables dans la pratique clinique.

CSA sont les cellules souches / progéniteurs qui restent dans le corps après le développement embryonnaire. Parmi celles-là, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes isolées de la moelle osseuse adulte et d'autres tissus qui peuvent générer des lignes adipocytaires, ostéoblastiques et chondrogéniques et, avec une moindre efficacité, des neurones, CMC, cellules bêta-pancréatiques ou des hépatocytes. Un autre type de CSA sont les cellules progéniteurs endothéliales (EPC) qui sont des cellules hématopoïétiques isolées à partir de la moelle osseuse ou de la circulation périphérique. Même si apparemment, elles ne se différencient pas vers CMC, les EPC aident à la régénération du myocarde par la promotion de l'angiogenèse et de la fourniture des signaux paracrines de protection de CMC.

Le présent ouvrage est divisé en deux sections principales. La première section décrit brièvement l'état actuel des connaissances et est organisée en 3 parties: (i) Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'ischémie-reperfusion cardiaque, (ii) "Le conditionnement cardiaque" – une nouvelle stratégie thérapeutique contre les lésions d'ischémie-reperfusion du cœur et (iii) Les cellules souches et leur potentiel thérapeutique dans la maladie cardiaque ischémique. La deuxième section de la thèse ("Contributions originales») montre l'apport de ce travail à l'enrichissement des connaissances dans le domaine des cellules souches et est organisée en huit chapitres. Ces chapitres présentent la standardisation et l'amélioration des modèles expérimentaux utilisés (la génération de nouvelles lignes de cellules souches embryonnaires et adultes, et des modèles expérimentaux de l'ischémie-reperfusion du myocarde *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*), et les résultats obtenus sur ces modèles; les résultats ont été publiés (ou sont en cours de publication) dans des journaux internationaux dans le domaine d'intérêt.

Une préoccupation constante pendant le stage de doctorat a été d'augmenter l'efficacité de la différenciation des cellules souches en CMC contractiles et de tirer parti des propriétés des cellules souches pour améliorer la structure et la fonction du myocarde infarci. Par conséquent, dans la première partie les études ont été dirigées vers la dérivation de lignées de CSE et obtenir un bon rendement de leur différenciation en CMC. Les résultats ont montré que la différenciation *in vitro* des CSE provenant de souris RAP (pour la première fois rapportées dans la littérature) en cellules cardiaques contractiles est dépendante du nombre initial de cellules souches utilisées et de leur niveau de compactage de corps embryoïdes (EB). Le remplacement du sérum fœtal (qui est le plus fréquemment utilisé pour la différenciation *in vitro* des CSE) avec KO-SR (Knock-Out serum replacement) lors de l'agrégation des CSE dans les EB a comme résultat une meilleure différenciation des CMC, en augmentant le pourcentage des EB contractiles produits.

En ce qui concerne les études menées sur des cellules souches adultes, elles se sont concentrées principalement sur l'analyse de la capacité de CSM de favoriser la régénération du myocarde après une lésion induite par l'ischémie-reperfusion. Pour réaliser ces études, plusieurs modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion ont été normalisés, comme il suit: le modèle expérimental murin d'ischémie *in vivo* (la souris avec ischémie-reperfusion myocardique, obtenue par la ligature transitoire de l'artère coronaire gauche et la souris avec ischémie des membres postérieurs obtenue, par la ligature permanente de l'artère fémorale), le modèle

expérimental d'ischémie-reperfusion cardiaque ex vivo dans le système Langerdorff et des modèles d'ischémie-reperfusion in vitro par l'incubation des sections de myocarde (fœtale, néonatale et adulte) dans des conditions d'ischémie (la présence d'un tampon ischémique qui imite chimiquement l'ischémie et une atmosphère de 1% O₂). Les principaux résultats originaux obtenus sur ces modèles sont les suivants:

1. Le myocarde fœtal, aussi que celui adulte sont touchés par l'ischémie, fait confirmé par la diminution de la viabilité tissulaire après une heure d'ischémie, et par les niveaux faibles de l'enzyme ERK1/2 phosphorylée. Même si le myocarde fœtal répond à une ischémie pareil au autres tissus ischémiques (augmentation des niveaux de SDF et VEGF sécrétés dans le milieu de culture), il est plus résistant à la reperfusion post-ischémique, comme démontré par le retour aux valeurs normales après un jour de reperfusion. En plus, le myocarde fœtal ne répond pas à l'ischémie par la formation de tissu cicatriciel, les niveaux de TGF- β étant diminuée en cas d'ischémie-reperfusion. Contrairement au myocarde fœtale, le myocarde adulte répond à l'ischémie en réduisant les niveaux de CGL et par formation de tissu cicatriciel (illustré par des niveaux accrus de TGF- β dans les deux surnageants et au niveau d'ARNm). La reperfusion induit une réponse inflammatoire (production accrue d'IL-6 après 1 heure de reperfusion post-ischémique), ainsi que des niveaux accrus de HGF et c-Met, impliqués dans le processus de réparation.

2. Dans des conditions de normoxie, aussi qu'en hypoxie, CSM et CPE ont des propriétés cardioprotecteurs et un effet stimulateur de l'angiogenèse, par lesquels elles peuvent contribuer à la régénération du myocarde. Aucune de ces populations, ne peut, par elle même, soutenir une angiogenèse efficace, représentée par l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales (CE) in vitro. CSM sont en mesure de promouvoir la migration et l'adhésion des CE, mais ne peuvent pas soutenir leur prolifération après l'adhésion. Contrairement aux CSM, les CPE montrent des effets complémentaires sur l'angiogenèse, étant capables de stimuler la prolifération des CE, mais pas leur adhésion au substrat. Ainsi, la combinaison de facteurs sécrétés par les CSM et les CPE a un fort effet positif sur le comportement des CE in vitro, indiquant la possibilité de développer des thérapies efficaces pour la régénération vasculaire grâce à l'utilisation simultanée de plusieurs populations de cellules souches / progéniteurs.

3. La transplantation sous-cutanée des CSM protège le myocarde des lésions induites par l'ischémie-reperfusion, et représente une possible stratégie thérapeutique avec des multiples applications cliniques. Les CSM transplantées dans une région éloignée du myocarde ("remote transplantation"), par une méthode non invasive, prolifèrent, mais ne migrent pas du site d'injection. Ces cellules produisent et sécrètent une variété de molécules avec rôle paracrine, dont ont été identifiés PTX3 et STG-6 (protéines ayant des effets cardioprotecteurs), et un certain nombre de cytokines pro- (TNF- α , IL-1 β) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-1RN), impliquées dans la modulation du processus inflammatoire. Les cœurs isolés des souris transplantées avec CSM montrent une zone d'infarctus considérablement réduite et une amélioration de la fonction cardiaque après l'ischémie-reperfusion, par rapport aux cœurs isolés des souris témoins.

4. Un autre résultat original est représenté par le fait que le modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque démontre l'importance de l'enregistrement ECG pendant la ligature LCA pour valider à la fois la ligature, aussi que et la reperfusion du vaisseau. Sans ajouter aucun inconvénient majeur en ce qui concerne la procédure, l'enregistrement ECG permet une validation objective de la ligature (l'élévation en hauteur du segment ST et la prolongation de l'intervalle QTc) et la reperfusion, après la libération de la ligature du vaisseau (restauration du profil normal de l'ECG); on peut ainsi éliminer le subjectivisme qui peut accompagner l'évaluation de la couleur rouge dans la région ischémique du cœur. De plus, l'ECG offre des informations importantes sur la gravité des changements provoqués par l'ischémie du myocarde, en démontrant une corrélation entre le profil de l'électrocardiographie et les modifications histologiques obtenues après l'ischémie-reperfusion.

Les résultats présentés dans cette thèse décrivent certains aspects importants concernant les mécanismes et les signaux moléculaires impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie-reperfusion et dans la transplantation des cellules souches dans le myocarde ischémique, contribuant ainsi au progrès de la recherche fondamentale dans le domaine des cellules souches, et des maladies cardiovasculaires.