

Cellules souches pluripotentes : un modèle cellulaire de développement cardiaque précoce

Michel Pucéat

INSERM-UMR 633, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France
Cellules souches et Cardiogenèse, INSERM campus genopole 1 (9100), 4 rue Pierre Fontaine 91058 Évry, France

Auteur correspondant : Michel Pucéat, michel.puceat@inserm.fr

Reçu le 5 décembre 2011

Résumé – Les cellules souches embryonnaires murines dérivées il y a trois décennies ont permis la transgénèse et la génération de souris génétiquement modifiées. Ces animaux et d'autres organismes plus primitifs, dans le passé comme encore aujourd'hui, ont permis l'étude des premières décisions cellulaires dans l'embryon. La dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines a apporté un modèle de développement dans un contexte où l'éthique n'autorise pas l'utilisation d'embryon. Il est alors devenu possible d'étudier les mécanismes génétiques et épigénétiques de ces décisions cellulaires humaines. Cette synthèse prend l'exemple de la cardiogenèse, un des premiers événements cellulaires au cours de l'embryogenèse et montre l'apport des cellules souches dans la biologie du développement cardiaque humain.

Mots clés : Cellules souches / développement cardiaque / valves

Abstract – Pluripotent stem cells: a cell model for early cardiac development.

Mouse embryonic stem cell lines were derived three decades ago and allow the process of transgenesis and in turn the generation of transgenic mice. In the past and still nowadays, these mice as well as more primitive organisms have provided models to study the first cell decisions in the embryo. Derivation of human embryonic stem cells more than a decade ago has provided a similar cell model for human early embryonic development, an issue that could not be addressed for obvious ethical reasons which limit research on human embryos. These cells allow investigating the genetic and epigenetic mechanisms underlying the first cell decisions in the human embryo. Herein, we use cardiogenesis as an example to reveal the potential of these cells to better understand the first steps of cardiac development.

Key words: Stem cells / cardiac development / valves

Introduction

Les biologistes du développement ont utilisé depuis longtemps de multiples organismes, du plus primitif (*Caenorhabditis elegans*, drosophile...) aux plus évolués (mammifères), pour décrypter les premières décisions cellulaires prises par l'embryon pour constituer un organisme entier. Il y a plus de 30 ans, le Dr. Gail Martin (Martin, 1975) isola des cellules de tératocarcinome dites pluripotentes (c'est-à-dire capables de se

différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires, ectoderme, endoderme et mésoderme). En 1981, le même auteur dérivait de véritables cellules souches embryonnaires (CSE) à partir du blastocyste murin (Martin, 1981). Il a fallu attendre 15 ans de plus pour obtenir des cellules souches embryonnaires de primate non humain (Thomson *et al.*, 1995), puis des cellules humaines (Thomson *et al.*, 1998). Ces cellules ont apporté un nouvel outil à la biologie du développement pour étudier les décisions cellulaires dans un contexte

humain, alors que les recherches sur l'embryon humain restent très limitées pour des raisons éthiques. Ces dernières années ont vu les chercheurs s'orienter à partir de modèles animaux vers la biologie du développement humain grâce à la disponibilité de ces cellules souches. Ces cellules peuvent-elles fidèlement refléter le développement humain cardiaque précoce ? Tel est l'objet de cette synthèse.

Spécification cardiaque des cellules souches dans l'embryon

Le myocarde est le premier tissu à se différencier et le cœur le premier organe à se former et à fonctionner dans l'embryon et le fœtus. Les premières cellules contractiles apparaissent à huit jours dans l'embryon murin et à trois semaines dans l'embryon humain. Les premières cellules spécifiées vers le phénotype cardiaque apparaissent avant le processus de gastrulation, dans la partie latérale postérieure de l'épiblaste murin (Tam *et al.*, 1997). Les premières décisions phénotypiques de détermination cellulaire ont lieu au début de la gastrulation au moment de la ségrégation du mésendoderme en endoderme définitif et en mésoderme. Le mésendoderme est en effet un feuillet intermédiaire bi-potent (Rodaway & Patient, 2001), duquel émanent les cellules endodermiques et mésodermiques. Le mécanisme cellulaire de cette ségrégation reste très mal connu chez le mammifère y compris chez la souris (Arnold & Robertson, 2009). Le gradient de Nodal et son facteur de transcription en aval, smad, jouent un rôle important dans cette ségrégation chez l'embryon de souris. Ce gradient régule l'expression de Oct-4 dans l'embryon et les CSE (Zeineddine *et al.*, 2006), ainsi que *eomes* (*Eomesodermin*) (Costello *et al.*, 2011). Nous avons montré que la surexpression de Oct-4 dans les CSE induisait l'expression de Sox17, un marqueur mésendodermique puis de *Mesp1*, un des premiers marqueurs cardiovasculaires (Kitajima *et al.*, 2000) et d'autres gènes cardiaques tels que *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Tbx5* (Stefanovic *et al.*, 2009 ; Stefanovic & Pucéat, 2010). Cette augmentation transitoire de Oct-4 est observée chez l'embryon (Zeineddine *et al.*, 2006) sous l'action de Nodal, ou de BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*). Ces événements cellulaires sont sans doute les plus précoces du processus de spécification cardiaque. Les CSE humaines permettent de décrypter ce processus dans un contexte embryonnaire humain.

La BMP2 a toujours constitué un morphogène cardiogénique très puissant tout au long de l'évolution

(Pucéat, 2006). Sécrété par l'endoderme viscéral (Madabhushi & Lacy, 2011), il agit en synergie avec *wnt3a*, sécrété également par l'endoderme viscéral et par des cellules de l'épiblaste postérieur (Rivera-Perez & Magnuson, 2005) pour induire le mésoderme cardiogénique. Ces deux morphogènes agissent également de concert sur les CSE pour induire l'expression en cascade de gènes, commençant par *Sox17* et *Hex1* (mésendoderme), puis *Brachyury*, *Mesp1*, *Tbx6* (mésoderme), et ensuite cardiaques, *Tbx20*, *Tbx5*, *Tbx18*, *GATA4*, *Isl1*, *Mef2c*, *Nkx2.5*. (Stefanovic *et al.*, 2009 ; Blin *et al.*, 2010) (figure 1).

Détermination des progéniteurs cardiaques

La détermination des progéniteurs cardiaques se produit au cours de la migration des cellules de l'épiblaste depuis la région postérieure jusqu'à la région antérieure, à travers la ligne primitive (Arai *et al.*, 1997 ; Auda-Boucher *et al.*, 2000), sous l'influence de facteurs de l'endoderme viscéral et de l'endoderme pharyngé. Ces facteurs incluent *Sonic Hedgehog* (SHH), la BMP2 et les FGFs. Les cellules de la région postérieure de l'épiblaste incluent probablement les ébauches de l'endocarde, de l'épicarde et du myocarde, comme suggéré dans les années 60 par les expériences de marquage et traçage cellulaires dans l'embryon de poulet (Stalsberg & DeHaan, 1969). Ce concept reste néanmoins à prouver par des approches expérimentales plus résolutes comme l'analyse clonale rétrospective (Meilhac *et al.*, 2004).

Au stade E7,5 chez la souris, les progéniteurs cardiaques du lignage primaire s'organisent en formant un croissant. Ces cellules participeront à la formation du tube cardiaque puis du ventricule gauche. Des cellules progénitrices cardiaques issues du mésoderme pharyngé (cellules mésodermiques latérales et para-axiales du pharynx) s'ajoutent au sein d'un second lignage en partie antérieure du croissant. Ces cellules progénitrices ont un fort potentiel de prolifération et contribuent à la formation du ventricule droit, des pôles artériel et veineux ainsi qu'à celle d'une partie des oreillettes (Vincent & Buckingham, 2010).

Nous avons donc cherché à recréer un secrétome similaire à celui des endodermes viscéral et pharyngé par une co-culture de progéniteurs issus de CSE humaines avec des fibroblastes embryonnaires (E13,5-E14) murins (Blin *et al.*, 2010). Ces progéniteurs ont pu d'abord être purifiés grâce à l'expression de SSEA-1 (*Stage Specific Embryonic Antigen*) ou CD15, un marqueur précoce de différenciation des CSE humaines. Induit spécifiquement par la BMP2 ajouté

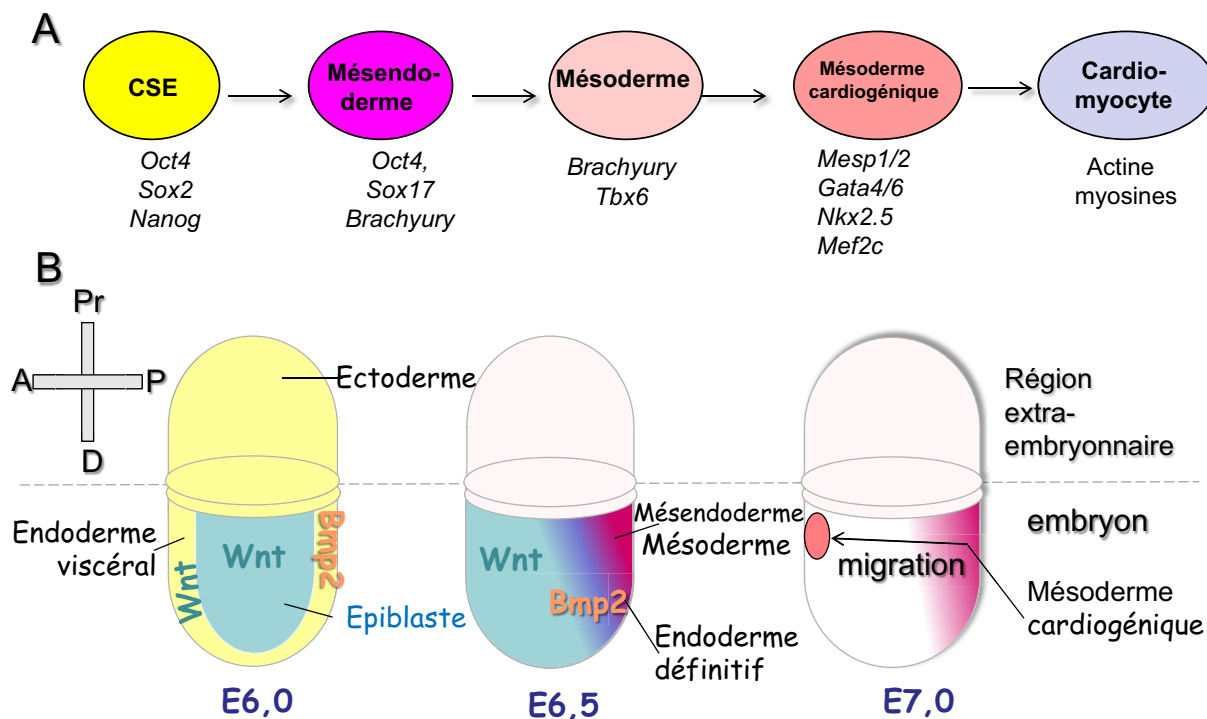


Fig. 1. Les CSE humaines récapitulent les premières étapes de la cardiogenèse (A) telles que représentées par l'embryon de souris aux stades E6,0–E7,0 (B) (axes : A = antérieur ; P = postérieur ; Pr = proximal ; D = distal).

aux CSE, il nous a permis de trier une population de progéniteurs du mésoderme cardiogénique (Blin *et al.*, 2010). Co-cultivé sur des fibroblastes embryonnaires pendant 5 jours, ces progéniteurs *Mesp1*⁺ expriment les facteurs de transcription cardiaques *Mef2c*, *Nkx2.5*, *Isl1*, *Tbx5* dans leurs noyaux, ce qui suggère que les fibroblastes ont sécrété les facteurs cardiogéniques nécessaires. L'ajout de FGF8 les oriente plus spécifiquement vers le lignage secondaire, comme en témoigne l'expression de *RALDH*, *Isl1*, *Tbx1*, *Hes1* ou *Foxh1* (Blin *et al.*, 2010).

L'ajout de PDGF, ou de VEGF, respectivement, à la co-culture permet d'obtenir une population de cellules musculaires lisses ou endothéliales (Blin *et al.*, 2010), deux lignages importants dans la formation du cœur.

Co-cultivées sur des fibroblastes et des cardiomyocytes atriaux isolés de jeunes enfants, les progéniteurs *SSEA-1*⁺, *Mesp1*⁺ se différencient en cardiomyocytes matures exprimant les protéines sarcomériques actinine et l'isoforme β (adulte) de la chaîne lourde de myosine (Blin *et al.*, 2010). Ces données nous ont confirmé que la population *SSEA-1*⁺ *Mesp1*⁺ était bien équivalente à une population de cellules déterminées vers un phénotype cardiaque que l'on retrouve dans la

partie antérieure de l'embryon au stade ligne primitive tardive (E7,0–E7,5).

Ces résultats montrent une nouvelle fois que ces CSE peuvent récapituler la cardiogenèse précoce.

Dérivation de fibroblastes valvulaires à partir de CSE

Les valves sont formées dans le cœur à partir de coussins cardiaques qui sont issus de l'endocarde du canal atrio-ventriculaire et des voies efférentes, au stade embryonnaire E9,5–E10 chez la souris. Les cellules endocardiques (endothéliales) déclenchent une délamination, puis la transition endothélio-mésenchymateuse (TEM) sous l'action du TGF β et de la BMP2 sécrétés par le myocarde adjacent (Combs & Yutzeys, 2009). Ces cellules se séparent ainsi du myocarde tout en sécrétant une gelée entre le myocarde et la couche endothéliale; le coussin grossit ensuite par suite de la prolifération cellulaire des cellules mésenchymateuses qui s'engage grâce au VEGF sécrété par l'endocarde. Ces coussins donnent alors naissance aux valves. Les valves atrio-ventriculaires dérivent exclusivement de l'endocarde du canal atrio-ventriculaire, alors que les

valves semi-lunaires (aortiques et pulmonaires) de la voie efférente incluent une contribution des cellules de la crête neurale (de Lange *et al.*, 2004).

Encouragés par nos observations montrant que les CSE pouvaient récapituler fidèlement la cardiogenèse précoce, nous avons voulu tester la possibilité d'obtenir un nouveau lignage cardiaque à partir de ces cellules pour générer des fibroblastes valvulaires.

Les progéniteurs SSEA-1⁺ et Mesp1⁺ ont été dirigés vers le lignage endothélial et plus spécifiquement vers celui qui dérive du lignage secondaire cardiaque, à l'aide des facteurs VEGF et FGF8. Ces cellules présentent un profil d'expression génique similaire à celui du canal atrio-ventriculaire avant le déclenchement du processus de TEM des cellules endocardiques. Elles expriment par exemple *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx20*, *Msx1*, *GATA5*, *smad6*, et *Pitx2* ainsi que les protéines Tbx20, Msx1, Isl1, Nfatc.

Elles sont capables de réaliser une TEM, *in vitro* quand elles sont stimulées par une forte concentration de BMP2, *ex vivo* lorsqu'elles sont déposées sur un hydrogel de collagène et un explant de coussins d'embryons de poulet, et *in vivo* quand on les injecte dans le canal atrio-ventriculaire de l'embryon murin à E10 ou dans le canal efférent dans l'embryon de poulet (Neri, Van Vliet *et al.*, soumis pour publication).

Conclusions

Les CSE humaines sont donc capables de récapituler pas à pas les étapes développementales de la cardiogenèse précoce. Elles constituent donc un modèle permettant d'étudier des questions fondamentales de biologie comme la formation du mésendoderme ou des lignages cardiaques, qui ne sont pas encore totalement élucidées. Elles offrent de plus une opportunité de mieux appréhender des questions de pathologies congénitales liées à des défauts potentiels de lignage cellulaire.

L'apport des cellules somatiques induites à la pluripotence (Takahashi & Yamanaka, 2006) permet l'étude des effets des pathologies sur le processus de développement cardiaque précoce et pourrait donc fournir un modèle cellulaire pour tester des composés pharmacologiques à caractère préventif ou thérapeutique.

Remerciements. La recherche de l'équipe est financée par l'ANR (programme blanc Specistem), la Fondation de la Recherche Médicale et la Fondation Leducq (réseau MITRAL). L'auteur remercie les membres de son équipe qui ont participé à ces travaux : Drs. Sonia Stefanovic, Tui Neri, David Nury et Guillaume Blin.

Références

- Arai A., Yamamoto K., Toyama J., Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation. *Dev Dyn*, 1997, 210, 344–353.
- Arnold S.J., Robertson E.J., Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10, 91–103.
- Auda-Boucher G., Bernard B., Fontaine-Perus J., Rouaud T., Mericksay M., Gardahaut M.F., Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors. *Dev Biol*, 2000, 225, 214–225.
- Blin G., Nury D., Stefanovic S., Neri T., Guillevic O., Brinon B., Bellamy V., Rucker-Martin C., Barbry P., Bel A., Bruneval P., Cowan C., Pouly J., Mitalipov S., Gouadon E., Binder P., Hagège A., Desnos M., Renaud J.F., Menasché P., Pucéat M., A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest*, 2010, 120, 1125–1139.
- Combs M.D., Yutzey K.E., Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res*, 2009, 105, 408–421.
- Costello I., Pimeisl I.M., Drager S., Bikoff E.K., Robertson E.J., Arnold S.J., The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of Mesp1 to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol*, 2011, 13, 1084–1091.
- De Lange F.J., Moorman A.F., Anderson R.H., Manner J., Soufan A.T., de Gier-de Vries C., Schneider M.D., Webb S., van den Hoff M.J., Christoffels V.M., Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res*, 2004, 95, 645–654.
- Kitajima S., Takagi A., Inoue T., Saga Y., MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*, 2000, 127, 3215–3226.
- Madabhushi M., Lacy E., Anterior Visceral Endoderm Directs Ventral Morphogenesis and Placement of Head and Heart *via* BMP2 Expression. *Dev Cell*, 2011, 21, 907–919.
- Martin G.R., Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell*, 1975, 5, 229–243.
- Martin G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78, 7634–7638.
- Meilhac S.M., Esner M., Kelly R.G., Nicolas J.F., Buckingham M.E., The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell*, 2004, 6, 685–698.
- Pucéat M., TGFbeta in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovasc Res*, 2006, 16, 16.

- Rivera-Perez J.A., Magnuson T., Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. *Dev Biol*, 2005, 288, 363–371.
- Rodaway A., Patient R., Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell*, 2001, 105, 169–172.
- Stalsberg H., DeHaan R.L., The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol*, 1969, 19, 128–159.
- Stefanovic S., Pucéat M., The dual role of OCT4. *Med Sci (Paris)*, 2010, 26, 411–416.
- Stefanovic S., Abboud N., Desilets S., Nury D., Cowan C., Pucéat M., Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol*, 2009, 186, 665–673.
- Takahashi K., Yamanaka S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126, 663–676.
- Tam P.P., Parameswaran M., Kinder S.J., Weinberger R.P., The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development*, 1997, 124, 1631–1642.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282, 1145–1147.
- Vincent S.D., Buckingham M.E., How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 90, 1–41.
- Zeineddine D., Papadimou E., Chebli K., Gineste M., Liu J., Grey C., Thurig S., Behfar A., Wallace V.A., Skerjanc I.S., Pucéat M., Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell*, 2006, 11, 535–546.