

Les cellules souches embryonnaires dans le traitement de l'insuffisance cardiaque sévère

Philippe Menasché^{1,2,3}

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité de chirurgie de l'insuffisance cardiaque, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

³ INSERM U 633, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75015 Paris, France

Auteur correspondant : Philippe Menasché, philippe.menasche@egp.aphp.fr

Reçu le 6 décembre 2011

Résumé – L'expérience acquise en thérapie cellulaire cardiaque suggère que la régénération de zones étendues de myocarde nécrosé ne peut sans doute pas procéder des seuls effets paracrines des cellules greffées mais requiert la transformation de ces cellules en cardiomyocytes capables de remplacer fonctionnellement ceux qui ont été perdus. C'est dans cette perspective que se justifie l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines dont la pluripotence permet une telle différenciation. Les résultats expérimentaux obtenus sur des modèles animaux d'infarctus du myocarde sont encourageants mais le passage à l'Homme exige que soient encore résolus plusieurs problèmes dont les plus importants sont l'optimisation de la spécification cardiaque des cellules, la sélection des progéniteurs ainsi obtenus afin de ne greffer qu'une population purifiée et non contaminée par des cellules pluripotentes résiduelles auxquelles est attaché un risque tumoral et, enfin, la maîtrise du rejet attendu de ces cellules allogéniques par des méthodes cliniquement acceptables. Si la solution de ces problèmes est un pré-requis absolu, le succès thérapeutique de cette approche dépend aussi de la capacité à développer des stratégies permettant un transfert efficace des cellules dans le tissu cible, le maintien de leur survie et leur organisation spatiale compatible avec une contribution à la fonction contractile du cœur.

Mots clés : Cellules souches embryonnaires / pluripotence / progéniteurs cardiaques / insuffisance cardiaque

Abstract – Embryonic stem cells in the treatment of severe cardiac insufficiency.

The experience accumulated in cardiac cell therapy suggests that regeneration of extensively necrotic myocardial areas is unlikely to be achieved by the sole paracrine effects of the grafted cells but rather requires the conversion of these cells into cardiomyocytes featuring the capacity to substitute for those which have been irreversibly lost. In this setting, the use of human pluripotent embryonic stem cells has a strong rationale. The experimental results obtained in animal models of myocardial infarction are encouraging. However, the switch to clinical applications still requires to address some critical issues, among which optimizing cardiac specification of the embryonic stem cells, purifying the resulting progenitor cells so as to graft a purified population devoid from any contamination by residual pluripotent cells which carry the risk of tumorigenesis and controlling the expected allogeneic rejection by clinically acceptable methods. If the solution to these problems is a pre-requisite, the therapeutic success of this approach will also depend on the capacity to efficiently transfer the cells to the target tissue, to keep them alive once engrafted and to allow them to spatially organize in such a way that they can contribute to the contractile function of the heart.

Key words: Embryonic stem cells / pluripotency / cardiac progenitors / heart failure

Rationnel

Les chiffres du rapport épidémiologique annuel de l'*American Heart Association* (Roger *et al.*, 2011) situent avec éloquence l'ampleur des problèmes médico-économiques que pose aujourd'hui l'insuffisance cardiaque dans les pays industrialisés : l'incidence de cette pathologie approche 10 pour 1000 après 65 ans et l'on estime à près de 6 millions le nombre d'américains insuffisants cardiaques. Les taux annuels de nouveaux épisodes d'insuffisance cardiaque augmentent avec l'âge de sorte que la prévalence de la maladie en Europe varie entre 10 % et 20 % dans la tranche des 70–80 ans (Dickstein *et al.*, 2008) avec un coût qui représente environ 2 % des budgets de santé. Le pronostic demeure globalement sévère puisque 50 % des patients sont morts à 4 ans. Après une hospitalisation pour insuffisance cardiaque, 40 % des patients décèdent ou sont réhospitalisés dans l'année qui suit.

Bien que la transplantation cardiaque demeure le seul traitement radical aux stades les plus avancés de la maladie, la pénurie de donneurs et les complications d'une lourde immunosuppression en limitent nécessairement les indications. Les interventions de remodelage chirurgical du ventricule gauche ne s'adressent qu'à des formes anatomiques particulières et les résultats négatifs, récemment rapportés, de l'étude STICH (absence de bénéfice d'un remodelage ventriculaire gauche associé au pontage coronaire par rapport à la seule revascularisation) vont sans doute conduire à restreindre les indications de ce type de procédure (Jones *et al.*, 2009). L'assistance ventriculaire mécanique reste principalement une solution temporaire de support du ventricule gauche dans l'attente d'une transplantation ; son utilisation comme traitement définitif reste marginale malgré l'amélioration des taux de survie (58 % à 2 ans, Slaughter *et al.*, 2011). Certes, la resynchronisation biventriculaire est un traitement symptomatique efficace mais elle ne s'adresse qu'à une catégorie ciblée de patients chez lesquels elle échoue d'ailleurs dans 20 % à 30 % des cas (Albouaini *et al.*, 2008). Enfin, il n'y a eu aucune avancée réelle dans le domaine pharmacologique au cours des 10 dernières années.

Il y a donc un besoin réel d'options thérapeutiques nouvelles et c'est dans ce cadre qu'a émergé la thérapie cellulaire avec pour objectif premier la régénération des zones myocardiques nécrosées.

Les premières études contrôlées randomisées utilisant les myoblastes squelettiques ou les cellules médullaires se sont révélées souvent négatives sur le critère principal de jugement (habituellement, la fraction d'éjection du ventricule gauche) ou n'ont montré que des bénéfices marginaux (Menasché, 2009). Il est

aujourd'hui admis que ces bénéfiques procèdent avant tout des effets paracrines exercés par les cellules greffées et non de leur transformation en cardiomyocytes (Cho *et al.*, 2007). Les cibles des facteurs ainsi libérés sont multiples et incluent notamment les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extra-cellulaire dans la direction d'une diminution de la fibrose, la limitation de l'apoptose et, peut-être, le recrutement de cellules souches endogènes (Mirotsoy *et al.*, 2011). À la lumière des résultats cliniques, on peut toutefois s'interroger sur la capacité de ces effets paracrines à générer une amélioration fonctionnelle significative au regard de l'étendue de la zone myocardique nécrosée qui caractérise, par définition, les patients potentiellement candidats à une thérapie cellulaire à visée « régénérative ». C'est dans ce contexte qu'a (ré)émergé le concept d'une transplantation de cellules susceptibles de devenir de véritables cardiomyocytes capables de remplacer, au moins partiellement, ceux qui ont été détruits et de s'intégrer dans le myocarde receveur, pré-requis à une contribution réelle à la fonction contractile.

Dès lors, le choix de telles cellules douées d'un potentiel de différenciation cardiomyogénique apparaît assez limité.

Les cellules souches cardiaques

La description de cellules souches cardiaques (Bollini *et al.*, 2010), susceptibles d'être mobilisées pharmacologiquement ou prélevées en vue d'expansion *in vitro* puis de réinjection, a représenté une véritable rupture avec le dogme admis de longue date et qui faisait du cœur un organe sans capacité d'auto-régénération. L'enthousiasme soulevé par ces travaux s'est assez vite concrétisé par la mise en œuvre de trois essais cliniques, deux aux États-Unis [CADUCEUS, NCT00893360 ; SCPIO, NCT00474461] et un au Japon [ALCADIA, NCT00981006] qui, au-delà de leurs différences méthodologiques, comportent tous un prélèvement biopsique de l'oreillette ou du ventricule droit (par une biopsie endomyocardique ou au cours d'un pontage coronaire), l'isolement des cellules souches présumées sur la base de marqueurs spécifiques, l'expansion de ces cellules puis leur réinjection par voie intra-coronaire. Cette approche pose toutefois de nombreuses questions non résolues : phénotype de ces cellules conditionnant directement le choix des marqueurs à utiliser pour leur identification, d'autant que plusieurs marqueurs différents ont été décrits ; capacité d'expansion *in vitro* sans perte de leur potentiel de différenciation, et surtout persistance dans le cœur humain adulte pathologique. Ainsi nos tentatives pour les isoler dans des fragments

de tissu cardiaque obtenus lors de pontages coronaires (c'est-à-dire chez des patients représentatifs des candidats potentiels à ce type de traitement) sont-elles restées vaines (Pouly *et al.*, 2008) et deux études récentes menées en chirurgie cardiaque pédiatrique aboutissent à des conclusions analogues en montrant que des cellules exprimant des marqueurs compatibles avec ceux habituellement attribués à des cellules souches existent bien dans le cœur néo-natal mais qu'on cesse de les retrouver au-delà de l'âge de 1 mois dans l'une de ces études (Amir *et al.*, 2008) ou de 3 ans dans l'autre (Mishra *et al.*, 2011). Dans ces conditions, on peut réellement s'interroger sur les résultats flamboyants (Bollí *et al.*, 2011) récemment rapportés lors de l'analyse intérimaire de l'essai SCIPIO (amélioration importante de la fonction ventriculaire gauche chez 14 patients ayant reçu une injection intra-coronaire de 1 million de cellules c-kit⁺ issues d'une biopsie auriculaire droite prélevée 4 mois plus tôt lors d'un pontage coronaire), compte tenu des failles méthodologiques de cette étude, au premier rang desquelles le pourcentage extrêmement faible (1,1 %) de cellules exprimant les marqueurs des lignages myocytaire, endothélial et musculaire lisse tout comme l'absence de comparaison statistique *entre* le groupe des 14 patients traités et celui des 7 témoins (les seules comparaisons étant *intra-groupe*).

Les cardiomyocytes obtenus à partir de cellules adultes induites à la pluripotence (*induced pluripotent cells* : iPS)

L'objectif est ici de redifférencier vers un phénotype cardiaque (Gai *et al.*, 2009) des cellules somatiques adultes reprogrammées pour retrouver un état de pluripotence « identique » (ce qu'on sait aujourd'hui être sans doute faux) à celui des cellules souches embryonnaires (CSE). Même si le développement extraordinairement rapide de cette technologie a récemment permis de reprogrammer les cellules sans le recours aux vecteurs viraux intégratifs qui en constituaient le principal inconvénient, cette approche reste limitée par son faible rendement et surtout le risque récemment souligné d'aberrations génétiques et épigénétiques (Pera, 2011) susceptibles d'effets oncogéniques. De plus, ce qui constituait l'avantage majeur (exception faite des problèmes éthiques) de ces cellules par rapport aux CSE, à savoir leur origine autologue et donc l'absence de tout risque de rejet, a été brutalement remis en cause par une étude qui suggère que la reprogrammation est susceptible de faire

exprimer des gènes identifiés comme étrangers et donc inducteurs d'une réponse immune (Zhao *et al.*, 2011). De fait, un consensus semble aujourd'hui se dégager pour penser que l'utilisation de ces cellules induites à la pluripotence pour modéliser des maladies ou tester la toxicité des drogues précédera vraisemblablement les applications en thérapie cellulaire.

Les fibroblastes reprogrammés

Il s'agit là d'une extension de la technique précédente puisque le but est de convertir directement des fibroblastes en cardiomyocytes sans les faire repasser par l'étape intermédiaire de cellule pluripotente puis re-différenciée. Même si la seule utilisation de quelques facteurs de croissance paraît suffisante (Ieda *et al.*, 2010) pour atteindre cet objectif, les travaux, dans ce domaine, en sont encore à un stade très préliminaire et ne permettent pas d'envisager une application clinique prochaine.

Les cellules souches mésenchymateuses « forcées » vers la cardiopoïèse

Décollant directement d'une étude précise des voies de signalisation et de l'identification des facteurs impliqués dans le développement cardiaque au cours de la vie embryonnaire, cette approche consiste à exposer des cellules souches mésenchymateuses autologues à un cocktail de ces facteurs afin de les « forcer » à s'engager dans une différenciation cardiomyogénique (Behfar *et al.*, 2010). Une première étude clinique utilisant de telles cellules ainsi modifiées vient de s'achever et les résultats préliminaires en paraissent encourageants. Toutefois, en l'absence d'un véritable groupe témoin (qui aurait consisté en cellules mésenchymateuses non modifiées), il reste impossible de savoir si les bénéfices observés procèdent réellement d'une transformation des cellules greffées en cardiomyocytes et ne reflètent pas simplement les effets paracrines bien documentés des cellules mésenchymateuses.

C'est dans ces conditions que se justifie l'exploration de la piste des CSE ou, plus précisément, des *progéniteurs cardiaques* qui peuvent en être dérivés, c'est-à-dire de cellules ayant perdu leur caractère pluripotent, déjà commises vers une destinée cardiaque, capables d'achever leur différenciation en cardiomyocytes sous l'influence des facteurs locaux présents dans une zone infarctée (Behfar *et al.*, 2002) et donc susceptibles de participer à la régénération du myocarde.

Résultats

De nombreux travaux *in vitro* ont aujourd'hui établi que les CSE humaines pouvaient acquérir les caractéristiques structurales et fonctionnelles de cardiomyocytes jeunes (Kehat *et al.*, 2001) et plus spécifiquement, l'expression des courants ioniques sous-tendant le couplage excitation-contraction (Sartiani *et al.*, 2007), la sensibilité aux effets chronotropes des drogues cardioactives (Brito-Martins *et al.*, 2008) et la capacité de se connecter aux cellules voisines grâce à l'expression des protéines de jonction intercellulaire comme la connexine 43 (Mummery *et al.*, 2002). Dans un modèle de bloc auriculo-ventriculaire chez le porc, l'injection intraventriculaire gauche de cardiomyocytes immatures dérivés de CSE humaines a permis la restauration d'un rythme cardiaque que les cartographies endocavitaires ont montré être initié par le foyer greffé, confirmant ainsi la capacité d'intégration électromécanique des cellules greffées dans le cœur du receveur (Kehat *et al.*, 2004). Dans le cadre de la dysfonction ventriculaire gauche d'origine ischémique, la transplantation de CSE humaines (dérivées de lignées différentes) dans des modèles murins (rat et souris) d'infarctus du myocarde a permis de constater que les CSE greffées se différenciaient en cardiomyocytes exprimant notamment la connexine 43 et amélioraient, dans la plupart des cas, la fonction ventriculaire gauche par rapport aux animaux témoins avec un effet également favorable sur le remodelage (Mummery *et al.*, 2002 ; Kofidis *et al.*, 2006 ; Caspi *et al.*, 2007 ; Dai *et al.*, 2007 ; Laflamme *et al.*, 2007 ; Leor *et al.*, 2007 ; Tomescot *et al.*, 2007 ; Van Laake *et al.*, 2007 ; Xie *et al.*, 2007 ; Cao *et al.*, 2008 ; Puymirat *et al.*, 2009 ; Fernandes *et al.*, 2010 ; Habib *et al.*, 2011). Cette différenciation est largement due aux signaux cardio-inducteurs locaux (Behfar *et al.*, 2002), au sein desquels le *Transforming Growth Factor* (TGF)- β joue un rôle important, et cette implication des voies de signalisation explique sans doute que la greffe de cardiomyocytes différenciés ne soit pas fonctionnellement plus efficace que celle de cellules encore au stage de progéniteurs (Smits *et al.*, 2009). Il a même été montré, sur un modèle *in vitro* de tissu cardiaque reconstruit par bio-ingénierie, que les progéniteurs cardiaques d'origine embryonnaire avaient une capacité d'intégration supérieure à celle de cardiomyocytes complètement différenciés (Song *et al.*, 2010). Si la capacité des CSE humaines (Pillekamp *et al.*, 2007) à générer une force mécanique laisse espérer que leurs effets bénéfiques sur la fonction myocardique sont en partie médiés par une contribution directe à la force contractile, on ne saurait cependant exclure que ces cellules agissent également par des effets paracrines qui

ont été documentés en ce qui concerne l'augmentation de l'angiogenèse (Van Laake *et al.*, 2009) et la limitation de l'apoptose (Singla *et al.*, 2007). Même si ces effets paracrines prédominaient sur la véritable régénération tissulaire à partir des cellules greffées, il est intéressant d'observer que ces effets semblent plus puissants (avec pour corollaire une cardio-protection accrue) lorsque les facteurs sont sécrétés par des CSE plutôt que par des cellules adultes, en l'occurrence médullaires (Cristosomo *et al.*, 2008).

Il est important de souligner que les résultats des expériences de transplantation doivent être interprétés avec prudence car ils sont sans doute biaisés dans le sens d'une moindre efficacité fonctionnelle pour trois raisons : l'absence habituelle de purification en cardiomyocytes des préparations cellulaires, le caractère xénogénique de ces transplantations et la discordance majeure entre la fréquence habituelle des battements d'une cellule cardiaque humaine (70–80 par minute) et celle des cœurs de rat ou de souris (300–400 par minute). Si l'on se souvient que la stimulation rapide est une méthode d'induction de l'insuffisance cardiaque, on conçoit que le stress ainsi imposé aux cellules humaines greffées puisse altérer leur fonction.

C'est précisément pour tenter d'éviter ces limites que nous avons développé un modèle se rapprochant davantage de la situation rencontrée en clinique humaine et consistant en une transplantation *allogénique* de CSE de singes Rhésus. L'infarctus a été créé chez ces primates par occlusion endo-coronaire transitoire réalisée par un cathéter et suivie de reperfusion afin de simuler au mieux la situation actuelle des patients dont l'infarctus a habituellement été revascularisé au stade initial. La particularité de ces CSE de Rhésus est qu'il s'agit d'une lignée clonale exprimant une protéine fluorescente (GFP) sous le contrôle d'un promoteur cardiaque (α -actine). Après expansion, ces cellules encore pluripotentes ont été pré-commises vers un phénotype cardiaque comme leurs homologues humains (voir plus loin), c'est-à-dire par exposition à la *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-2. Quinze jours après l'infarctus, une thoracotomie a été pratiquée et les progéniteurs cardiaques ainsi obtenus ont été greffés par injections intra-myocardiques directes ou dépôt sur l'épicaire pathologique. Tous les singes ont été immuno-déprimés pharmacologiquement. Deux et 3 mois après la transplantation, nous avons pu confirmer la différenciation des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes, authentifiés par des plages de cellules fluorescentes GFP⁺ en immuno-histochimie avec une recolonisation relativement importante (environ 20 %) de la zone infarctée par les cellules injectées. Un tératome a été observé après greffe de progéniteurs *non triés* alors

qu'aucun des singes injectés avec des cellules CD15⁺ triées n'a développé une telle tumeur. Par ailleurs, lorsque ces CSE ont été co-cultivées avec un mélange de cellules simulant – autant que faire se peut – celui d'une zone infarctée (cellules cardiaques et fibroblastes humains), elles ont également acquis un phénotype de cardiomyocytes avec une taille de sarcomères identique à celle de cellules cardiaques adultes et une expression membranaire de connexine 43 (Blin *et al.*, 2010). Il convient néanmoins de souligner que si ce modèle est particulièrement pertinent pour juger de l'évolution phénotypique des cellules, de la réponse immune qu'elles induisent et surtout de l'éventuel développement d'une tumeur, la sensibilité des primates à l'ischémie ne permet pas de créer des infarctus étendus, ce qui rend difficile l'évaluation des effets fonctionnels de la greffe ; la mauvaise tolérance de ces animaux aux immunosuppresseurs est une limite supplémentaire.

Obstacles

Certains sont spécifiques des CSE et d'autres communs à tous les produits de thérapie cellulaire.

Obstacles spécifiques aux CSE

1- Choix de la lignée

Les CSE sont dérivées d'embryons surnuméraires conçus dans le cadre d'une procréation médicalement assistée et ne faisant plus l'objet d'un projet parental. Elles sont issues de la masse cellulaire interne de blastocystes (4-6 jours après la fécondation), stade auquel les cellules sont encore pluripotentes. Au terme de la dernière révision de la loi de Bioéthique, l'utilisation de CSE reste interdite... sauf dérogation. Elle est donc, de fait, permise sous contrôle de l'Agence de la Bio-médecine après validation du dossier scientifique (pertinence, faisabilité, expertise de l'équipe).

Dans le cadre d'un projet à finalité clinique, le choix d'une lignée donnée est fonction de plusieurs paramètres qui incluent au premier chef les conditions de sa dérivation initiale (seules les lignées les plus récentes l'ont été selon des modalités pouvant satisfaire aux normes réglementaires des Bonnes Pratiques de Fabrication mais des lignées plus anciennes dont la dérivation a comporté des produits d'origine animale ne sont pas nécessairement exclues d'un usage clinique dès lors qu'elles ont été extensivement sécurisées sur le plan virologique et qu'il existe une robuste traçabilité des milieux et ancillaires utilisés). Doivent également

être prises en compte la capacité proliférative de la lignée, son orientation phénotypique préférentielle (voir plus loin), la solidité des garanties éthiques quant aux conditions de son obtention et l'autorisation de l'organisme propriétaire d'utiliser les cellules à des fins cliniques.

2- Amplification

L'amplification des CSE se fait habituellement sur des cellules nourricières, en pratique des fibroblastes (embryonnaires murins ou dermiques humains) irradiés. Des milieux définis sans cellules ont également été proposés (Nakahara *et al.*, 2009) mais leur application à une amplification à grande échelle reste à établir. Pour des raisons de propriété industrielle, aucune des deux sociétés américaines qui ont initié des essais cliniques avec des CSE humaines (pré-orientées en oligodendrocytes ou en progéniteurs rétiniens pour traiter des patients paraplégiques ou souffrant de dégénérescence maculaire, respectivement) n'a révélé la technique utilisée pour l'expansion. Pour notre essai clinique utilisant des CSE pré-commises vers un phénotype cardiaque, l'amplification de la lignée retenue (I6, Technion Institute, Haïfa, Israël) s'est faite sur des fibroblastes humains de grade clinique à raison d'un passage hebdomadaire, avec vérification répétée du maintien de l'expression des gènes de pluripotence (Oct4, nanog, Sox2, Lefty, DNMT3b) et de l'absence d'anomalies cytogénétiques (contrôlées par le caryotype, l'hybridation *in situ* utilisant des sondes spécifiques des chromosomes connus comme à risque d'instabilité et des puces à ADN à la recherche de micro-remaniements génomiques). Sur ce plan, il est intéressant de noter que la formation de tératomes ait été corrélée non pas aux anomalies caryotypiques ou au nombre de passages mais plutôt à la technique utilisée pour collecter les cellules au moment de ces passages (la collagénase étant moins génératrice de tératomes que la trypsine) (Hentze *et al.*, 2009). À l'avenir, le développement des cultures en suspension dans un bio-réacteur devrait permettre des productions à grande échelle, standardisées, mieux sécurisées et répondant davantage à une logique industrielle (Kirouac & Sandstra, 2008).

3- Spécification

Dans des conditions de culture appropriées, les CSE forment progressivement des agrégats constitués par des dérivés des trois feuilles embryonnaires (corps embryoïdes) et au sein desquels on peut, au bout de quelques semaines, identifier des structures battantes correspondant à des cardiomyocytes différenciés.

L'extraction de ces zones par micro-dissection, bien que techniquement possible, n'est pas compatible avec une greffe clinique ; celle-ci requiert en pratique l'exposition des CSE en culture à des morphogènes capables de les orienter vers un phénotype cardiaque. Le principe général est de reproduire *in vitro* les principales étapes du développement embryonnaire normal en traitant les CSE encore indifférenciées par des facteurs de transcription impliqués dans la cardiopoïèse. Plusieurs protocoles de spécification ont ainsi été proposés (Mayorga *et al.*, 2009). Le rôle important joué par le *Transforming Growth Factor* (TGF)- β (Pucéat, 2007) sous-tend le choix des constituants de plusieurs de ces milieux, y compris celui développé dans notre équipe par Michel Pucéat et qui comporte principalement l'utilisation de la BMP-2 comme morphogène cardio-instructeur. Quatre jours d'exposition des CSE pluripotentes à ce facteur permettent à 30 %-40 % d'entre elles de s'engager dans une voie de différenciation mésendodermique aboutissant à la génération de progéniteurs, définis par l'expression de l'antigène SSEA-1 (ou CD15) et capables, en fonction des signaux reçus, de donner naissance à trois des populations constitutives du coeur (cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules vasculaires lisses). Une différenciation multiforme a également été décrite à partir de progéniteurs définis par leur positivité pour le marqueur *fetal liver kinase* (flk)-1 (Kattman *et al.*, 2006). Il est notable que la BMP-2 augmente l'expression de Oct-4, qui, en activant un promoteur (Sox17), majore la production de BMP-2 (et de Wnt3), orientant ainsi les cellules vers la voie du mésendoderme puis du mésoderme cardiaque (Stéfanovic *et al.*, 2009). Ainsi apparaît l'ambivalence de ces facteurs classiques de pluripotence qui sont certes impliqués dans le maintien d'un état indifférencié mais agissent aussi comme les inducteurs d'une voie de différenciation donnée (l'endoderme dans le cas de Nanog, le neuro-ectoderme dans celui de Sox2...). La pluripotence tend donc à n'être plus conçue comme un état stable maintenu par l'action synergique de plusieurs facteurs (Oct4, Nanog, Sox2...) mais plutôt comme un état dynamique dû à une inhibition compétitive entre des facteurs qui tendent à engager les cellules dans des voies de spécialisation mutuellement exclusives ; l'augmentation d'expression d'un d'entre eux rompt cet équilibre et permet l'engagement des cellules vers le lignage contrôlé par ce facteur (ecto-, méso- ou endodermique) tandis que les autres facteurs cessent d'être exprimés (Loh & Lim, 2011). Pour cette raison, la surexpression de Oct4 par les progéniteurs cardiaques SSEA-1⁺ n'est pas un marqueur inquiétant de la persistance de leur pluripotence mais bien le témoin (au demeurant transitoire) de leur engagement dans la

cardiopoïèse qui va de pair avec la baisse d'expression des autres facteurs transcriptionnels (Nanog, Sox2).

4- Sélection

Ainsi que cela a été rappelé plus haut, l'exposition des CSE à des morphogènes ne permet qu'à une fraction de la population de s'engager dans la voie de différenciation ciblée. Il convient donc d'éliminer le contingent de cellules qui a échappé à ce processus de pré-orientation et dont la pluripotence résiduelle comporte un risque tumoral. Plusieurs stratégies ont été développées dans ce but (Hentze *et al.*, 2006). Le principe des méthodes les plus utilisées a été soit de transférer les CSE avec un gène de résistance aux antibiotiques sous contrôle d'un promoteur cardiaque (typiquement le promoteur de la chaîne lourde de la myosine cardiaque contrôlant un gène de résistance à la néomycine) soit de transférer les CSE avec un gène suicide, codant pour une enzyme capable de convertir un précurseur pharmacologique inactif en sa forme cytotoxique (typiquement la thymidine kinase du virus de l'herpès transformant le ganciclovir en un métabolite toxique). L'efficacité de ces approches implique toutefois qu'au moins trois conditions soient réunies : (1) une intégration du gène assurant que les cellules issues de la prolifération des CSE seront toutes transfectées ; (2) la transfection de la totalité de la population de CSE considérées ; (3) l'absence de réponse immune qui risquerait de compromettre la survie du greffon cellulaire. De surcroît, ces manipulations génétiques introduisent un niveau supplémentaire de complexité réglementaire qui se surajoute à celle inhérente à un produit de thérapie cellulaire allogénique. Aussi, dans une perspective clinique, la sélection repose-t-elle plutôt sur l'expression de marqueurs de surface permettant un tri non par cytométrie de flux (il n'existe pas, à notre connaissance, de fluorochromes de grade clinique) mais par anticorps couplés à des billes magnétiques. C'est cette stratégie que nous avons utilisée en ciblant l'antigène SSEA-1 exprimé par les cellules engagées dans une voie de différenciation. Cette technique est efficace mais peut sans doute être optimisée par élimination rapide des billes après passage à travers la colonne magnétique afin d'éviter que ces dernières ne gênent l'adhésion des cellules ou par sélection négative à l'aide d'anticorps ciblant des marqueurs de pluripotence à expression membranaire, telle la *podocalyxin-like Protein-1* (Hentze *et al.*, 2009).

Il est évident qu'on ne peut à ce jour garantir qu'au terme de l'étape de sélection, la population retenue est pure à 100 %, c'est-à-dire n'est pas encore « contaminée » par des cellules résiduelles pluripotentes ou

dirigées vers un autre phénotype que celui qui est recherché. Le véritable problème est de définir le seuil critique au-delà duquel l'utilisation d'une telle préparation cellulaire peut devenir dangereuse et doit donc être proscrite. Bien que des études aient montré qu'il peut suffire de deux cellules encore pluripotentes pour générer un tératome (Kiuru *et al.*, 2009), d'autres travaux suggèrent un seuil maximal de 1000 cellules indifférenciées par milligramme de tissu cardiaque (Behfar *et al.*, 2005); au-delà de cette limite, le risque est que les capacités cardio-inductrices du myocarde transplanté vis-à-vis de cellules encore indifférenciées soient « débordées » et permettent ainsi le maintien dans le tissu greffé de cellules conservant un potentiel pluripotent et donc potentiellement oncogénique. L'évaluation pré-clinique de ce potentiel, et par là même la validation de la méthode de sélection utilisée, reposent sur une batterie de tests qui incluent notamment (1) la vérification cytogénétique que les polymorphismes présents dans le produit de thérapie cellulaire final n'incluent pas la délétion de zones suppressives de tumeurs ou, à l'inverse, l'addition de fragments porteurs de proto-oncogènes ; (2) l'administration, à des souris immuno-déficientes, de préparations à la fois purifiées et intentionnellement contaminées avec des proportions diverses de cellules indifférenciées afin de déterminer le pourcentage de ces dernières au-delà duquel une tumeur apparaît (l'injection sous-cutanée des cellules dans le matrigel apparaissant comme un modèle sensible et pertinent, Prokhorova *et al.*, 2009) ; et (3) l'ultime vérification, immédiatement avant la greffe, de l'extinction des gènes de pluripotence dans les cellules pré-commises, aux niveaux génomique et éventuellement protéomique. Dans la cadre de l'essai clinique visant à tester des oligodendrocytes dérivés de CSE humaines chez des patients présentant une paraplégie traumatique, la société Géron a rapporté la survenue de tératomes à partir de 10 % de CSE encore indifférenciées (Hentze *et al.*, 2009). Compte tenu des incertitudes persistantes, abaisser ce seuil nous semble un objectif plus prudent.

5- Immunogénicité

Si les cellules, lorsqu'elles sont encore à un stade de progéniteurs, peuvent être considérées comme immuno-privilégiées du fait de l'absence d'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et des molécules de co-stimulation, il n'en est plus de même lorsqu'elles achèvent leur différenciation en cardiomyocytes (Calderon *et al.*, 2011) et les travaux expérimentaux sont concordants pour montrer

que leur transplantation induit une réponse immune à la fois cellulaire et humorale (Grinnemo *et al.*, 2006 ; Swijnenburg *et al.*, 2008). Tout essai clinique utilisant des dérivés de CSE humaines se doit donc d'inclure un protocole d'immunosuppression.

À ce jour, ces protocoles restent principalement fondés sur les drogues classiques que sont la cyclosporine et le tacrolimus. L'absence dans le greffon de cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques) laisse espérer une immunogénicité réduite compatible avec des doses de drogues plus faibles que celles nécessaires en transplantation d'organe et se rapprochant des posologies utilisées pour traiter certaines maladies auto-immunes (Heydendael *et al.*, 2002). La durée optimale du traitement n'est pas non plus définie ; les premiers essais cliniques utilisant des cellules allogéniques (oligodendrocytes dérivés de CSE humaines chez des patients atteints de paraplégie traumatique et cellules souches neurales d'origine foetale chez des patients présentant une maladie neurodégénérative de Pelizaeus-Merzbacher) ont opté pour des traitements de 6 mois, ce qui semble éthiquement défendable tant que le rapport risque-bénéfice de ce type de transplantations reste incertain, et ce d'autant que l'interruption de l'immunosuppression après 6–12 mois chez des patients parkinsoniens ayant reçu des greffes intra-cérébrales de neurones dopaminergiques ne semble pas se traduire automatiquement par une perte du bénéfice fonctionnel (Lindvall & Kokaia, 2009).

Il est cependant évident que d'autres approches doivent être développées pour optimiser le contrôle du rejet au prix d'un minimum d'effets indésirables. La constitution de banques de CSE permettant un appariement immunologique des antigènes du CMH a été proposée, notamment sur la base de l'hypothèse selon laquelle 150 lignées pourraient être suffisantes pour permettre d'apparier les haplotypes d'une population (Taylor *et al.*, 2005). Cette approche est cependant discutable car elle sous-estime sans doute la variabilité de ces haplotypes dans des sociétés multiethniques (Fraga *et al.*, 2011) et de surcroît ne règle pas le problème de l'immunogénicité liée à la persistance des antigènes du complexe mineur d'histocompatibilité (Fairchild, 2010). La constitution de telles banques représente en outre un défi logistique et économique que peu de structures sont sans doute prêtes à relever dans l'immédiat.

Plus prometteuse semble être l'induction de tolérance dont la réalité est attestée par les observations cliniques qui commencent à être rapportées en transplantation d'organes (Scandling *et al.*, 2011). Le scénario idéal serait ici de dériver, à partir d'une lignée de CSE, des cellules souches hématopoïétiques puis de les administrer au futur receveur avant la transplantation

des dérivés différenciés issus de la même lignée, une fois obtenu le chimérisme attendu. Indépendamment des problèmes spécifiquement liés à la différenciation hématopoïétique des CSE, un tel protocole paraît difficile à concevoir en pratique clinique pour au moins deux raisons : (1) la purge initiale de la moelle exige un conditionnement (irradiation lymphoïde, chimiothérapie) dont on ne peut prévoir la tolérance chez des patients insuffisants cardiaques souvent âgés ; (2) cette induction d'une tolérance centrale implique l'intégrité du fonctionnement du thymus qui joue un rôle clé dans la sélection négative des lymphocytes T réactifs aux antigènes du donneur et la génération d'un répertoire de lymphocytes T rendus tolérants vis-à-vis de ces derniers ; or l'âge de ces patients va de pair avec une atrophie thymique (Chidgey *et al.*, 2008 ; Fairchild, 2010). Il semble donc plus réaliste de cibler une tolérance périphérique et différentes stratégies sont ici possibles : co-transplantation de cellules souches mésenchymateuses (Chidgey *et al.*, 2008) si leur effet tolérogène *in vitro* était confirmé *in vivo* ou de cellules dendritiques immatures issues du donneur exprimant les alloantigènes vis-à-vis desquels la tolérance est requise (Fairchild, 2010) ; blocage des molécules de co-stimulation (Chidgey *et al.*, 2008) ; stimulation de la production de lymphocytes T régulateurs telle que peut la réaliser l'administration d'anticorps monoclonaux anti-CD3 (Chatenoud, 2003), déjà testés avec succès en clinique (Keymeulen *et al.*, 2010).

Obstacles communs à tous les produits de thérapie cellulaire

1- Dosage

Il est extrêmement difficile de définir le nombre optimal de cellules à transplanter en pratique clinique. Ce chiffre varie d'ailleurs sans doute d'un patient à l'autre en fonction de l'étendue de la zone à « régénérer ». D'un point de vue purement théorique, il pourrait être possible, grâce à l'imagerie pré-opératoire, d'estimer la masse de myocarde nécrosé et donc d'en déduire le nombre optimal de cellules à transplanter pour remplacer celles qui ne sont plus fonctionnelles. Encore faudrait-il que ce nombre tienne compte du nombre de divisions des progéniteurs une fois implantés. On conçoit que la superposition de ces approximations rende difficile l'implémentation clinique d'une approche ainsi personnalisée. Dans un premier temps, il semble plus réaliste de s'en tenir à un chiffre fixe et plutôt modeste (nous l'avons fixé à 10 millions) à la fois parce qu'expérimentalement, l'effet dose-effet ne

semble pas linéaire (Van Laake *et al.*, 2009) et que les considérations sécuritaires devant primer lors des essais de phase I, limiter le nombre de cellules réduit d'autant l'éventuel contingent « contaminant » de cellules encore pluripotentes, et donc le risque tumoral qui leur est associé.

2- Transfert

Qu'elles soient faites par voie épiscopidique, lors d'un geste associé de chirurgie cardiaque, ou par voie endocardique, à l'aide d'un cathéter intra-ventriculaire gauche et couplé à un système de navigation permettant de cibler les zones à transplanter, les injections de cellules ne sont globalement pas efficaces en raison des fuites importantes dans le péricarde ou la circulation systémique. De plus, le principe même de l'injection n'est pas satisfaisant en raison de ses multiples inconvénients : distribution aléatoire et imprécise des cellules ; faible reproductibilité (ce qui pose un problème dans le cadre d'essais multicentriques) ; création de multiples foyers intra-myocardiques qui, indépendamment du type cellulaire injecté, peuvent provoquer des blocs de conduction et donc devenir arythmogènes (Fukushima *et al.*, 2007) ; enfin, nécessité d'une dissociation des cellules qui porte en elle les germes de leur mort par apoptose du fait de la disparition des signaux de survie liés aux connexions entre les cellules et à leur ancrage à une matrice (Zvibel *et al.*, 2002 ; Robey *et al.*, 2008). Aussi, lorsque le transfert des cellules se fait à thorax ouvert (cas des patients opérés) est-il sans doute préférable de substituer aux injections multiples le dépôt des cellules sur l'épicarde de la zone pathologique. Ce dépôt peut se faire en cultivant d'abord, *in vitro*, les CSE (ou des progéniteurs pré-commis à un phénotype cardiaque) en présence de cellules douées d'effets trophiques (fibroblastes et cellules endothéliales) puis à déposer la feuille constituée par ces différentes populations (qui ne comporte donc aucun matériau étranger) sur la zone infarctée (Stevens *et al.*, 2009 ; Zakharova *et al.*, 2010 ; Matsuura *et al.*, 2009, 2011). Toutefois, malgré le bénéfice fonctionnel rapporté avec cette approche dans les publications précitées, les problèmes pratiques posés par la manipulation de ces constructions intrinsèquement fragiles peut leur faire préférer l'ensemencement des cellules (ou le co-ensemencement des différentes populations cellulaires) sur un support résorbable et biocompatible doué de meilleures propriétés mécaniques, qu'il s'agisse d'un film en collagène (Hamdi *et al.*, 2009), d'un hydrogel tel une matrice de fibrine (Xiong *et al.*, 2011) ou d'une matrice extracellulaire cardiaque décellularisée (Baharvand *et al.*, 2005 ; Duan *et al.*, 2011) ; de tels

biomatériaux sont ainsi plus faciles à transférer sur le cœur où leur fixation peut se faire soit spontanément, soit par collage ou sutures. Chez des patients non opérés, le recours obligé au cathétérisme ne permet pas d'éviter les injections mais l'incorporation des cellules dans un biomatériau, notamment un hydrogel (chitosan, Lu *et al.*, 2009 ; alginate, Yu *et al.*, 2010 ; polyéthylène glycol, Kraehenbuehl *et al.*, 2008 ; Habib *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2011) ou une matrice extracellulaire décellularisée, notamment péricardique (Singelyn *et al.*, 2009), semble une solution efficace pour améliorer la rétention immédiate du greffon et sa survie ultérieure.

3- Survie

Un facteur important de l'efficacité limitée de la thérapie cellulaire à ce jour est le pourcentage très élevé de mort des cellules ; en effet, quelques semaines après la greffe, le nombre de cellules encore identifiables ne représente plus que 1 à 2 % du chiffre initial. Si la mort cellulaire est un phénomène multifactoriel, deux facteurs jouent cependant un rôle important : (1) l'ischémie inhérente à l'hypovascularisation des zones dans lesquelles elles sont transplantées, et (2) la perte des signaux de survie liés à la cohésion des cellules entre elles et à leur adhérence à la matrice extracellulaire dès lors qu'elles sont enzymatiquement dissociées en vue de l'injection.

La prise en compte du premier facteur justifie la revascularisation directe, percutanée ou chirurgicale, de la zone greffée chaque fois qu'elle est techniquement possible. Dans les autres cas, la co-transplantation de cellules douées de propriétés angiogéniques est une option rationnelle. De fait, l'intérêt de cette combinaison de cellules à finalité myogénique et de cellules-supports apportant un soutien trophique a désormais été établi avec plusieurs types de populations cellulaires et procède sans doute d'une complémentarité des effets paracrines (Sekine *et al.*, 2008 ; Winter *et al.*, 2009) ; dans le cadre des CSE humaines, il a notamment été montré, dans un modèle d'infarctus chez le rat, que leur association à des cellules souches mésenchymateuses médullaires permettait une récupération de la fonction cardiaque post-infarctus significativement supérieure à celle observée après greffe de chacun des types cellulaires greffés isolément (Puymirat *et al.*, 2009).

Comme il a été dit plus haut, l'apoptose peut être contrôlée en ensemençant les cellules sur une matrice qui permet non seulement d'améliorer la rétention immédiate du greffon mais peut aussi, en créant un environnement tridimensionnel, favoriser la survie, la prolifération et la différenciation des cellules. S'il est

aujourd'hui établi que le transfert de cellules maintenues solidaires entre elles et avec une matrice est supérieure à la seule injection intra-myocardique de cellules en suspension vis-à-vis de la survie du greffon (Matsuura *et al.*, 2009 ; Sekine *et al.*, 2011), de nombreux problèmes restent en suspens : la nature biochimique optimale de la matrice qui conditionne notamment la cinétique de sa dégradation, l'importance de la réponse inflammatoire qu'elle peut générer et la nature des signaux inducteurs de la différenciation ; ses propriétés physiques, et notamment sa porosité et son module d'élasticité dont on sait l'influence sur la différenciation cellulaire (Guilak *et al.*, 2009) ; le rôle adjuvant essentiel de l'incorporation de motifs favorisant l'adhésion des cellules, voire de facteurs de croissance. Il reste aussi important d'établir si, et dans quelles conditions, les cellules greffées peuvent migrer hors de la matrice pour coloniser le myocarde et s'ordonner selon une disposition anisotrope. Sur ce plan, on soulignera l'intérêt potentiel d'incorporer des nanostructures dans une matrice afin de favoriser la fonctionnalité des cellules et leur assemblage tri-dimensionnel (Dvir *et al.*, 2011).

4- Suivi *in vivo*

L'évaluation de ces différentes techniques destinées à améliorer à la fois le transfert initial des cellules puis leur survie ultérieure requiert de pouvoir suivre leur devenir dans le tissu cible après la greffe. On sait maintenant que l'utilisation de cellules chargées en nanoparticules ferriques pour permettre une identification basée sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM) comporte un risque de faux positifs si les cellules mortes ont libéré le fer qui peut alors être recapté par les macrophages (Amsalem *et al.*, 2007). L'une des techniques paraissant la plus fiable est basée sur la transfection des cellules par un gène codant pour une protéine qui, au contact de son ligand, émet un signal qu'on peut identifier par tomographie d'émission de positons ou IRM. L'observation d'un patient chez lequel cette technique a été utilisée pour suivre le devenir de lymphocytes administrés dans le cadre du traitement d'un glioblastome (Yaghoubi *et al.*, 2009) suggère son application possible en clinique humaine mais il est clair que l'imagerie cellulaire reste un domaine où des progrès importants restent à faire pour évaluer le devenir intra-tissulaire des cellules greffées.

5- Évaluation clinique

À ce jour, la plupart des études cliniques de thérapie cellulaire ont utilisé comme critère principal de jugement la fraction d'éjection ventriculaire gauche, indicateur

certaines faciles à obtenir et à quantifier mais dont on connaît aussi les limites. En ce qui concerne les CSE, il est évident que les premiers essais doivent avant tout évaluer la sécurité (et, à ce titre, comporter notamment un suivi très étroit et régulier à la recherche d'une tumeur). L'évaluation de l'efficacité ne viendra que dans un second temps et la tendance serait plutôt de la focaliser sur la fonction et la géométrie ventriculaires régionales (zone greffée). Les critères « durs » exigés par les agences réglementaires (mortalité, événements cardio-vasculaires indésirables) ne peuvent naturellement s'envisager que dans le cadre d'essais contrôlés et randomisés dont la complexité logistique et le coût exigeront d'abord la démonstration sans équivoque de la preuve du principe telle que peuvent l'apporter des études de phase II relativement plus simples à réaliser.

L'utilisation de progéniteurs cardiaques dérivés de CSE humaines apparaît donc comme une option attractive pour reconstituer une partie du pool de cardiomyocytes détruits dans le cadre d'une cardiopathie, notamment ischémique. Le rationnel fondé sur la greffe de cellules douées d'un potentiel de différenciation cardiomyogénique est solide et les résultats expérimentaux, encourageants. Le succès de cette approche complexe dépend toutefois de la maîtrise de procédés de production visant les plus hauts standards en matière d'assurance-qualité, compte tenu du risque tumoral lié à la persistance d'éléments pluripotents et du caractère dévastateur qu'aurait sur l'ensemble de la thérapie cellulaire un échec dans le domaine sécuritaire. De nombreux espoirs sont actuellement fondés sur cette voie thérapeutique ; il convient de les tempérer car l'impatience des attentes se heurte à la durée incompressible des travaux de recherche encore indispensables pour développer des stratégies permettant de régler les problèmes immunologiques, d'optimiser le transfert des cellules dans la zone cible du cœur et de créer les conditions environnementales de leur survie.

Remerciements. Ce travail a été soutenu par l'INSERM, l'Université Paris Descartes, l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, l'Association Française contre les Myopathies, la Fondation de France, la Fondation de l'Avenir, la Fondation Cœur et Artères, la Fondation LeDucq et la Fondation Thierry Desmarest.

Références

- Albouaini K., Egred M., Rao A., Alahmar A., Wright D.J., Cardiac resynchronisation therapy: evidence based benefits and patient selection. *Eur J Intern Med*, 2008, 19, 165–172.
- Amir G., Ma X., Reddy V.M., Hanley F.L., Reinhartz O., Ramamoorthy C., Riemer R.K., Dynamics of human myocardial progenitor cell populations in the neonatal period. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86, 1311–1319.
- Amsalem Y., Mardor Y., Feinberg M.S., Landa N., Miller L., Daniels D., Ocherashvili A., Holbova R., Yosef O., Barbash I.M., Leor J., Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation*, 2007, 116, T38–T45.
- Baharvand H., Azarnia M., Parivar K., Ashtiani S.K., The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38, 495–503.
- Behfar A., Zingman L.V., Hodgson D.M., Rauzier J.M., Kane G.C., Terzic A., Pucéat M., Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J*, 2002, 16, 1558–1566.
- Behfar A., Hodgson D.M., Zingman L.V., Perez-Terzic C., Yamada S., Kane G.C., Alekseev A.E., Pucéat M., Terzic A., Administration of allogenic stem cells dosed to secure cardiogenesis and sustained infarct repair. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1049, 189–198.
- Behfar A., Yamada S., Crespo-Diaz R., Nesbitt J.J., Rowe L.A., Perez-Terzic C., Gaussin V., Homsy C., Bartunek J., Terzic A., Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56, 721–734.
- Blin G., Nury D., Stefanovic S., Neri T., Guillevic O., Brinon B., Bellamy V., Rücker-Martin C., Barbry P., Bel A., Bonnevie L., Bruneval P., Cowan C., Pouly J., Mitalipov S., Gouadon E., Binder P., Hagège A., Desnos M., Renaud J.F., Menasché Ph., Pucéat M., A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in post-myocardial infarcted non-human primates. *J Clin Invest*, 2010, 120, 1125–1139.
- Bolli R., Chugh A.R., D'Amario D., Loughran J.H., Stoddard M.F., Ikram S., Beache G.M., Wagner S.G., Leri A., Hosoda T., Sanada F., Elmore J.B., Goichberg P., Cappetta D., Solankhi N.K., Fahsah I., Rokosh D.G., Slaughter M.S., Kajstura J., Anversa P., Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2011, 378, 1847–1857.
- Bollini S., Smart N., Riley P.R., Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50, 296–303.
- Brito-Martins M., Harding S.E., Ali N.N., Beta(1)- and beta(2)-adrenoceptor responses in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: comparison with failing and non-failing adult human heart. *Br J Pharmacol*, 2008, 153, 751–759.
- Calderon D., Planat-Benard V., Bellamy V., Vanneaux V., Khun C., Peyrard S., Larghero J., Desnos M., Casteilla L., Pucéat M., Menasché P., Chatenoud L., Immune

- response to human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors and adipose-derived stromal cells. *J Cell Mol Med*, 2011. Doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01435.x. [Epub ahead of print]
- Cao F., Wagner R.A., Wilson K.D., Xie X., Fu J.D., Drukker M., Lee A., Li R.A., Gambhir S.S., Weissman I.L., Robbins R.C., Wu J.C., Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*, 2008, 3, e3474.
- Caspi O., Huber I., Kehat I., Xie X., Fu J.D., Drukker M., Lee A., Li R.A., Gambhir S.S., Weissman I.L., Robbins R.C., Wu J.C., Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50, 1884–1893.
- Chatenoud L., CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3, 123–132.
- Chidgey A.P., Layton D., Trounson A., Boyd R., Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. *Nature*, 2008, 453, 330–337.
- Cho H.J., Lee N., Lee J.Y., Choi Y.J., Li M., Wecker A., Jeong J.O., Curry C., Qin G., Yoon Y.S., Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J Exp Med*, 2007, 204, 3257–3269.
- Cristosomo P.R., Abarbanell A.M., Wang M., Lahm T., Wang Y., Meldrum D.R., Embryonic stem cells attenuate myocardial dysfunction and inflammation after surgical global ischemia via paracrine actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 295, H1726–H1735.
- Dai W., Field L.J., Rubart M., Reuter S., Hale S.L., Zweigerdt R., Graichen R.E., Kay G.L., Jyrala A.J., Colman A., Davidson B.P., Pera M., Kloner R.A., Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43, 504–516.
- Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G., McMurray J.J., Ponikowski P., Poole-Wilson P.A., Strömberg A., van Veldhuisen D.J., Atar D., Hoes A.W., Keren A., Mebazaa A., Nieminen M., Priori S.G., Swedberg K., ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC guidelines for the diagnosis of acute and chronic heart failure 2008. *Eur Heart J*, 2008, 29, 2388–2442.
- Duan Y., Liu Z., O'Neill J., Wan L.Q., Freytes D.O., Vunjak-Novakovic G., Hybrid gel composed of native heart matrix and collagen induces cardiac differentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011, 5, 605–615.
- Dvir T., Timko B.P., Kohane D.S., Langer R., Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6, 13–22.
- Fairchild P., The challenge of immunogenicity in the quest for induced pluripotency. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10, 868–875.
- Fernandes S., Naumova A.V., Zhu W.Z., Laflamme M.A., Gold J., Murry C.E., Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49, 941–949.
- Fraga A.M., Sukoyan M., Rajan P., Paes de Almeida Ferreira Braga D., Iaconelli A., Franco J.G., Borges E., Pereira L.V., Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. *Cell Transplant*, 2011, 20, 431–440.
- Fukushima S., Varela-Carver A., Coppen S.R., Yamahara K., Felkin L.E., Lee J., Barton P.J., Terracciano C.M., Yacoub M.H., Suzuki K., Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation*, 2007, 115, 2254–2261.
- Gai H., Leung E.L., Costantino P.D., Aguila J.R., Nguyen D.M., Fink L.M., Ward D.C., Ma Y., Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts. *Cell Biol Int*, 2009, 33, 1184–1193.
- Grinnemo K.H., Kumagai-Braesch M., Månsson-Broberg A., Skottman H., Hao X., Siddiqui A., Andersson A., Strömberg A.M., Lahesmaa R., Hovatta O., Sylven C., Corbascio M., Dellgren G., Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13, 712–724.
- Guilak F., Cohen D.M., Estes B.T., Gimble J.M., Liedtke W., Chen C.S., Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*, 2009, 5, 17–26.
- Habib M., Shapira-Schweitzer K., Caspi O., Gepstein A., Arbel G., Aronson D., Seliktar D., Gepstein L., A combined cell therapy and *in situ* tissue-engineering approach for myocardial repair. *Biomaterials*, 2011, 32, 7514–7523.
- Hamdi H., Furuta A., Bellamy V., Bel A., Puymirat E., Peyrard S., Agbulut O., Menasché P., Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87, 1196–1203.
- Hentze H., Graichen R., Colman A., Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol*, 2006, 25, 24–32.
- Hentze H., Soong P.L., Wang S.T., Phillips B.W., Putti T.C., Dunn N.R., Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Research*, 2009, 2, 198–210.
- Heydendael V.M., Spuls P.I., Ten Berge I.J., Opmeer B.C., Bos J.D., de Rie M.A., Cyclosporin trough levels: is monitoring necessary during short-term treatment in psoriasis? A systematic review and clinical data on trough levels. *Br J Dermatol*, 2002, 147, 122–129.

- Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D., Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142, 375–386.
- Jones R.H., Velazquez E.J., Michler R.E., Sopko G., Oh J.K., O'Connor C.M., Hill J.A., Menicanti L., Sadowski Z., Desvigne-Nickens P., Rouleau J.L., Lee K.L., STICH Hypothesis 2 Investigators. Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction. *N Engl J Med*, 2009, 360, 1705–1717.
- Kattman S.J., Huber T.L., Keller G.M., Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*, 2006, 11, 723–732.
- Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L., Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 2001, 108, 407–414.
- Kehat I., Khimovich L., Caspi O., Gepstein A., Shofti R., Arbel G., Huber I., Satin J., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L., Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004, 22, 1282–1289.
- Keymeulen B., Walter M., Mathieu C., Kaufman L., Gorus F., Hilbrands R., Vandemeulebroucke E., Van de Velde U., Crenier L., De Block C., Candon S., Waldmann H., Ziegler A.G., Chatenoud L., Pipeleers D., Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia*, 2010, 53, 614–623.
- Kirouac D.C., Zandstra P.W., The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell*, 2008, 3, 369–381.
- Kiuru M., Boyer J., O'Connor T.P., Crystal R.G., Genetic control of wayward pluripotent stem cells and their progeny after transplantation. *Cell Stem Cell*, 2009, 4, 289–300.
- Kofidis T., Lebl D.R., Swijnenburg R.J., Greeve J.M., Klima U., Robbins R.C., Allopurinol/uricase and ibuprofen enhance engraftment of cardiomyocyte-enriched human embryonic stem cells and improve cardiac function following myocardial injury. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 29, 50–55.
- Kraehenbuehl T.P., Zammaretti P., Van der Vlies A.J., Schoenmakers R.G., Lutolf M.P., Jaconi M.E., Hubbell J.A., Three-dimensional extracellular matrix-directed cardioprogenitor differentiation: Systematic modulation of a synthetic cell-responsive PEG-hydrogel. *Biomaterials*, 2008, 29, 2757–2766.
- Laflamme M., Chen K.Y., Naumova A.V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E.A., Ueno S., Yuan C., Gold J., Murry C.E., Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 2007, 25, 1015–1024.
- Leor J., Gerecht S., Cohen S., Miller L., Holbova R., Ziskind A., Shachar M., Feinberg M.S., Guetta E., Itskovitz-Eldor J., Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium. *Heart*, 2007, 93, 1278–1284.
- Lindvall O., Kokaia Z., Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30, 260–267.
- Loh K.M., Lim B., A precarious balance: Pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell Stem Cell*, 2011, 8, 363–369.
- Lu W.N., Lü S.H.L., Wang H.B., Li D.X., Duan C.M., Liu Z.Q., Hao T., He W.J., Xu B., Fu Q., Song Y.C., Xie X.H., Wang C.Y., Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. *Tissue Eng*, 2009, 15, 1437–1447.
- Matsuura K., Honda A., Nagai T., Fukushima N., Iwanaga K., Tokunaga M., Shimizu T., Okano T., Kasanuki H., Hagiwara N., Komuro I., Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119, 2204–2217.
- Matsuura K., Masuda S., Haraguchi Y., Yasuda N., Shimizu T., Hagiwara N., Zandstra P.W., Okano T., Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets. *Biomaterials*, 2011, 32, 7355–7362.
- Mayorga M., Finan A., Penn M., Pre-transplantation specification of stem cells to cardiac lineage for regeneration of cardiac tissue. *Stem Cell Rev Rep*, 2009, 5, 51–60.
- Menasché P., Cell-based therapy for heart disease: a clinically oriented perspective. *Mol Ther*, 2009, 17, 758–766.
- Mirotsov M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J., Gnecci M., Dzau V.J., Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50, 280–289.
- Mishra R., Vijayan K., Colletti E.J., Harrington D.A., Matthies T.S., Simpson D., Goh S.K., Walker B.L., Almeida-Porada G., Wang D., Backer C.L., Dudley S.C. Jr., Wold L.E., Kaushal S., Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients. *Circulation*, 2011, 123, 364–373.
- Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden M., Opthof T., Pera M., de la Rivière A.B., Passier R., Tertoolen L., Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*, 2002, 107, 2733–2740.
- Nakahara M., Saeki K., Nakamura N., Matsuyama S., Yogiashi Y., Yasuda K., Kondo Y., Yuo A., Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11, 5–18.

- Pera M.F., The dark side of induced pluripotency. *Nature*, 2011, 471, 46–47.
- Pillekamp F., Reppel M., Rubenchyk O., Pfannkuche K., Matzkies M., Bloch W., Sreeram N., Brockmeier K., Hescheler J., Force measurements of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in an *in vitro* transplantation model. *Stem Cells*, 2007, 25, 174–180.
- Pouly J., Bruneval P., Mandet C., Proksch S., Peyrard S., Amrein C., Bousseaux V., Guillemain R., Deloche A., Fabiani J.N., Menasché P., Cardiac stem cells in the real world. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135, 673–678.
- Prokhorova T.A., Harkness L.M., Frandsen U., Ditzel N., Schröder H.D., Burns J.S., Kassem M., Teratoma formation by human embryonic stem cells is site-dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem Cells Dev*, 2008, 18, 47–54.
- Pucéat M., TGF- β in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovasc Res*, 2007, 74, 256–261.
- Puymirat E., Geha R., Tomescot A., Bellamy V., Larghero J., Trinquart L., Bruneval P., Desnos M., Haggège A., Pucéat M., Menasché P., Can mesenchymal stem cells induce tolerance to cotransplanted human embryonic stem cells? *Mol Ther*, 2009, 17, 176–182.
- Robey T.E., Saiget M.K., Reinecke H., Murry C.E., Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45, 567–581.
- Roger V., Go A.S., Lloyd-Jones D.M., Adams R.J., Berry J.D., Brown T.M., Carnethon M.R., Dai S., de Simone G., Ford E.S., Fox C.S., Fullerton H.J., Gillespie C., Greenlund K.J., Hailpern S.M., Heit J.A., Ho P.M., Howard V.J., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Makuc D.M., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McDermott M.M., Meigs J.B., Moy C.S., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Rosamond W.D., Sorlie P.D., Stafford R.S., Turan T.N., Turner M.B., Wong N.D., Wylie-Rosett J., American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2011, 123, e18–e209.
- Sartiani L., Bettiol E., Stillitano F., Mugelli A., Cerbai E., Jaconi M.E., Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells*, 2007, 25, 1136–1144.
- Scandling J.D., Busque S., Shizuru J.A., Engleman E.G., Strober S., Induced immune tolerance for kidney transplantation. *N Engl J Med*, 2011, 365, 1359–1360.
- Sekine H., Shimizu T., Hobo K., Sekiya S., Yang J., Yamato M., Kurosawa H., Kobayashi E., Okano T., Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation*, 2008, 118, S145–S152.
- Sekine H., Shimizu T., Dobashi I., Matsuura K., Hagiwara N., Takahashi M., Kobayashi E., Yamato M., Okano T., Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function *via* superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Eng*, 2011, 17, 2973–2980.
- Singelyn J.M., DeQuach J.A., Seif-Naraghi S.B., Littlefield R.B., Schup-Magoffin P.J., Christman K.L., Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*, 2009, 30, 5409–5416.
- Singla D.K., McDonald D.E., Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 293, H1590–H1595.
- Slaughter M.S., Meyer A.L., Birks E.J., Destination therapy with left ventricular assist devices: patient selection and outcomes. *Curr Opin Cardiol*, 2011, 26, 232–236.
- Smits A.M., van Laake L.W., den Ouden K., Schreurs C., Szuhai K., van Echteld C.J., Mummery C.L., Doevendans P.A., Goumans M.J., Human cardiomyocyte progenitor cell transplantation preserves long-term function of the infarcted mouse myocardium. *Cardiovasc Res*, 2009, 83, 527–535.
- Song H., Yoon C., Kattman S.J., Dengler J., Massé S., Thavaratnam T., Gewarges M., Nanthakumar K., Rubart M., Keller G.M., Radisic M., Zandstra P.W., Regenerative Medicine Special Feature: Interrogating functional integration between injected pluripotent stem cell-derived cells and surrogate cardiac tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 3329–3334.
- Stefanovic S., Abboud N., Désilets 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.
- Stevens K.R., Kreutziger K.L., Dupras S.K., Korte F.S., Régnier M., Muskheli V., Nourse M.B., Bendixen K., Reinecke H., Murry C.E., Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 16568–16573.
- Swijnenburg R.J., Schrepner S., Govaert J., Cao F., Ransohoff K., Sheikh A.Y., Haddad M., Connolly A.J., Davis M.M., Robbins R.C., Wu J.C., Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 12991–12996.
- Taylor C.J., Bolton E.M., Pocock S., Sharples L.D., Pedersen R.A., Bradley A., Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet*, 2005, 366, 2019–2025.
- Tomescot A., Leschik J., Bellamy V., Dubois G., Messas E., Bruneval P., Desnos M., Haggège A.A., Amit M., Itskovitz J., Menasché P., Pucéat M., Differentiation *in vivo* of cardiac committed human embryonic stem cells in post-myocardial infarcted rats. *Stem Cells*, 2007, 25, 2200–2205.

- Van Laake L.W., Passier R.P., Monshouwer-Kloots J., Verkleij A.J., Lips D.J., Freund C., den Ouden K., Ward-van Oostwaard D., Korving J., Tertoolen L.G., van Echteld C.J., Doevendans P.A., Mummery C.L., Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res*, 2007, 1, 9–24.
- Van Laake L.W., Passier R., den Ouden K., Schreurs C., Monshouwer-Kloots J., Ward-van Oostwaard D., van Echteld C.J., Doevendans P.A., Mummery C.L., Improvement of mouse cardiac function by hESC-derived cardiomyocytes correlates with vascularity but not graft size. *Stem Cell Res*, 2009, 3, 106–112.
- Wang H., Liu Z., Li D., Guo X., Kasper F.K., Duan C., Zhou J., Mikos A.G., Wang C., Injectable biodegradable hydrogels for embryonic stem cell transplantation: improved cardiac remodeling and function of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 2011. Doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01409.x. [Epub ahead of print].
- Winter E.M., van Oorschot, Hogers B., van der Graaf L.M., Doevendans P.A., Poelmann R.E., Atsma D.E., Gittenberger-de-Groot A.C., Goumans M.J., A new direction for cardiac regeneration therapy. Application of synregistically acting epicardium-derived cells and cardiomyocyte progenitor cells. *Circ Heart Failure*, 2009, 2, 643–653.
- Xie C.Q., Zhang J., Xiao Y., Zhang L., Mou Y., Liu X., Akinbami M., Cui T., Chen Y.E., Transplantation of human undifferentiated embryonic stem cells into a myocardial infarction rat model. *Stem Cells Dev*, 2007, 16, 25–29.
- Xiong Q., Hill K.L., Li Q., Suntharalingam P., Mansoor A., Wang X., Jameel M.N., Zhang P., Swingen C., Kaufman D.S., Zhang J., A fibrin patch-based enhanced delivery of human embryonic stem cell-derived vascular cell transplantation in a porcine model of postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells*, 2011, 29, 367–375.
- Yaghoubi S.S., Jensen M.C., Satyamurthy N., Budhiraja S., Paik D., Czernin J., Gambhir S.S., Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma. *Nat Clin Pract Oncol*, 2009, 6, 53–58.
- Yu J., Du K.T., Fang Q., Gu Y., Mihardja S.S., Sievers R.E., Wu J.C., Lee R.J., The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat. *Biomaterials*, 2010, 27, 7012–7020.
- Zakharova L., Mastroeni D., Mutlu N., Molina M., Goldman S., Diethrich E., Gaballa M.A., Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovasc Res*, 2010, 87, 40–49.
- Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y., Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 474, 212–215.
- Zvibel I., Smets F., Soriano H., Anoikis: roadblock to cell transplantation? *Cell Transplant*, 2002, 11, 621–630.