



HAL
open science

Reprogrammation nucléaire de cardiomyocytes vers un stade progéniteur par fusion partielle avec des cellules souches adultes

Adrien Acquistapace

► **To cite this version:**

Adrien Acquistapace. Reprogrammation nucléaire de cardiomyocytes vers un stade progéniteur par fusion partielle avec des cellules souches adultes. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0078 . tel-00733068

HAL Id: tel-00733068

<https://theses.hal.science/tel-00733068>

Submitted on 17 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE de DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Reprogrammation nucléaire de cardiomyocytes vers un stade
progéniteur par fusion partielle avec des cellules souches adultes**

Présentée par **Adrien ACQUISTAPACE**

Dirigée par le Dr. Anne-Marie RODRIGUEZ

Soutenue le 26 Octobre 2011 devant le jury composé de

Pr. Serge ADNOT

Pr. Patricia LEMARCHAND

Pr. Christian JORGENSEN

Dr. Gillian BUTLER-BROWNE

Dr. Stéphane GERMAIN

Dr. Anne-Marie RODRIGUEZ

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse



THESE de DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Reprogrammation nucléaire de cardiomyocytes vers un stade
progéniteur par fusion partielle avec des cellules souches adultes**

Présentée par **Adrien ACQUISTAPACE**

Dirigée par le Dr. Anne-Marie RODRIGUEZ

Soutenue le 26 Octobre 2011 devant le jury composé de

Pr. Serge ADNOT

Pr. Patricia LEMARCHAND

Pr. Christian JORGENSEN

Dr. Gillian BUTLER-BROWNE

Dr. Stéphane GERMAIN

Dr. Anne-Marie RODRIGUEZ

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens, en tout premier lieu, à remercier le Docteur Anne-Marie Rodriguez qui a dirigé mon travail de thèse. Son dynamisme, sa détermination et sa disponibilité ont été une vraie leçon pour moi. Je la remercie également pour la confiance qu'elle a su me témoigner et pour l'intérêt qu'elle porte à ses collaborateurs.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Serge Adnot qui nous a accueillis dans son équipe et qui a accepté d'être le président de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements aux Professeurs Patricia Lemarchand et Christian Jorgensen qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. J'associe à ces remerciements les Directeurs de recherche Gillian Butler-Browne et Stéphane Germain qui ont accepté d'en être les examinateurs.

Je remercie tous les membres de l'ex-équipe 22 : Amélie, Aurélie, Florence, Gauthier, Jonathan, Muhieddine, Olivier, Pierre-François, Pryscille et Séverine. Merci pour les bons moments passés ensemble dans le bureau, dans le labo ou au L2. Je garderai en mémoire quelques bons fous rires et autres discussions très intéressantes ainsi que l'esprit de solidarité et d'amitié qui règne au sein de l'équipe. Je leur souhaite tous mes vœux de réussites professionnelle et personnelle.

J'aimerais par ailleurs souligner la contribution de plusieurs collaborateurs à cette thèse. Sans leur concours, ce travail n'aurait pas eu le mérite d'exister. Un merci tout particulier à Thierry Bru pour son importante contribution à ce travail. Je le remercie pour son écoute et les discussions que nous avons eues tout au long de son séjour au sein de l'équipe 10. Entre gars du sud, on se comprenait. Merci à Xavier Baudin et Tristan Piolot de la Plate-forme d'imagerie de l'Institut Jacques Monod. Un grand merci à Rachid Souktani pour son soutien et pour ses conseils.

Spéciale dédicace aux membres du Codopodo : Adam, Asmaa, Aude, Corine, Guillaume, Josselin, Lydie, Merieme, Nathalie, Omar et Shahul. Un grand merci pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, au labo mais aussi en dehors (en

partie grâce à l'IMRB qui a financé l'équipement de la salle 5055 et les sorties du Codopodo). Merci pour toutes les discussions n'ayant aucun rapport avec la recherche que nous avons eues, ça fait du bien de parler d'autre chose. J'espère que le Codopodo continuera d'exister encore longtemps car c'est un très bon moyen de rencontrer des personnes confrontées aux mêmes situations que vous, de partager son expérience, d'échanger des conseils et tout simplement de sortir un peu de sa routine quotidienne. J'associe également à ces remerciements Candice, qui au fil du temps est devenue un membre associé au Codopodo et qui, au même titre que les autres personnes de ce comité, est devenue une amie plus qu'une collègue. Merci aussi pour tout le travail qu'elle effectue en tant que secrétaire de l'ED.

Parmi tous les gens côtoyés à la faculté de médecine, je tiens à remercier les membres de l'équipe 10 avec qui j'ai partagé plus qu'un simple couloir tout au long de ces 4 années. Merci également à Corinne, pour sa gentillesse. Une petite pensée pour Sylvie et Cyril de la laverie, toujours disponibles pour rendre les choses plus faciles.

Je tiens à remercier chaleureusement tous mes anciens collègues de l'INRA que j'ai connus durant mes années à Versailles mais aussi ceux que j'ai rencontrés par la suite. Mention spéciale à Deldel et Chounou et Grinjeau. Une pensée également pour les autres : Anne-Emmanuelle, les clandestinos Romi et Sebi, Emmanuelle, Nico, Nono, Philippe, Sophie, Yo et tous les membres de l'unité PISC et du centre de Versailles que j'ai croisés à un moment ou à un autre.

Je suis également reconnaissant envers ma famille et mes amis. Je remercie tout particulièrement mes parents pour leur soutien dans les moments difficiles. J'ai également une pensée très spéciale pour mon grand père et mon oncle qui ne verront pas l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous mes amis français, grecs ou venant d'autres pays pour leurs encouragements à chaque fois que nous nous sommes retrouvés, ici ou ailleurs.

Un dernier mot pour remercier Fotini de tout mon cœur pour son soutien, son écoute et ses encouragements. C'est en grande partie grâce à elle que j'ai eu le courage et l'envie de terminer ce doctorat.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
AVANT-PROPOS	13
1. LES CELLULES SOUCHES.....	15
1.1. Définition de la cellule souche	15
1.2. Les différents types de cellules souches	16
1.3. Les cellules souches embryonnaires (ES).....	17
1.3.1. Mécanismes de préservation de la pluripotence des cellules ES.....	18
<i>Régulation génique</i>	19
<i>Régulation épigénétique</i>	21
<i>Régulation par des facteurs extrinsèques</i>	22
1.3.2. Induction de la pluripotence par reprogrammation nucléaire	22
<i>Transfert nucléaire</i>	23
<i>Reprogrammation par extraits</i>	23
<i>Reprogrammation par fusion cellulaire forcée</i>	23
<i>Reprogrammation par introduction de gènes</i>	24
1.4. Les cellules souches adultes (CSA)	27
1.4.1. Difficultés de caractérisation des CSA	27
1.4.2. Autorenewement, quiescence et durée de vie des CSA	28
<i>Le concept de niche</i>	29
<i>L'autorenewement des CSA</i>	31
<i>Mécanismes intrinsèques de régulation de la durée de vie des CSA</i>	32
1.4.3. Sources de confusion dans l'identification de populations de CSA	34
<i>Capacité d'autorenewement à long terme</i>	34
<i>Capacité de différenciation</i>	34
<i>Capacité de régénération tissulaire</i>	34
<i>Expression et fonction des gènes de pluripotence dans les CSA</i>	35
1.5. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	37
1.5.1. Découverte et origine	37
1.5.2. Définition des CSM selon l'ISCT	38
1.5.3. Usage des CSM en thérapie cellulaire	39
1.6. Les CSM du tissu adipeux	40
1.6.1. Le tissu adipeux	40
1.6.2. Les cellules souches du TAB	40
<i>Découverte et caractéristiques</i>	40
<i>Utilisation des ADSC en pharmacologie et thérapie</i>	41
1.6.3. Les cellules hMADS.....	42
<i>Obtention et caractéristiques</i>	42
<i>Plasticité in vitro</i>	44
<i>Plasticité in vivo</i>	46

2. L'INFARCTUS DU MYOCARDE (IDM)	48
2.1. Conséquences fonctionnelles de l'IDM	48
2.2. Prise en charge des patients atteints d'IDM	49
2.3. Remodelage myocardique post-infarctus	50
2.4. L'insuffisance cardiaque.....	51
2.5. Enjeux de la thérapie cardiaque	52
3. THERAPIE CELLULAIRE CARDIAQUE	53
3.1. Enjeux de la thérapie cellulaire cardiaque et choix de la cellule.....	53
3.2. Principaux types cellulaires utilisés	54
3.3. Essais cliniques.....	55
3.4. Autres voies de recherche.....	56
3.4.1. Sources alternatives de cellules	56
3.4.2. Voies d'administration et amélioration de la survie cellulaire	58
3.5. Mécanismes de régénération médiés par les CSA : exemple du cœur	59
3.5.1. Effets paracrines et régénération cardiaque	60
<i>Protection myocardique, survie cellulaire et néovascularisation</i>	60
<i>Remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque</i>	61
<i>Mobilisation de cellules souches ou de progéniteurs endogènes</i>	61
3.5.2. Fusion ou transdifférenciation ?	63
<i>Plasticité cellulaire</i>	63
<i>Plasticité des cellules souches et régénération myocardique</i>	65
3.5.3. La fusion cellulaire	67
<i>Fusion cellulaire et correction d'un défaut génétique</i>	70
<i>Fusion cellulaire et stress, lésion ou nature de l'organe</i>	70
<i>Fusion cellulaire et inflammation chronique</i>	71
4. OBJECTIFS ET PRESENTATION DE L'ETUDE	72
MATERIEL ET METHODES.....	75
1. Isolement et culture cellulaire	75
<i>Cellules hMADS</i>	75
<i>CSM humaines de moelle osseuse</i>	75
<i>Fibroblastes humains MRC5</i>	76
<i>Obtention de la lignée de cellules hMADS déplétées en mitochondries</i> (<i>hMADS $\rho 0$</i>).....	76
2. Lignées murines et isolement des cardiomyocytes et des neurones ganglionnaires	76
<i>Cardiomyocytes adultes</i>	77
<i>Cardiomyocytes néonataux</i>	78
<i>Neurones de ganglions rachidiens</i>	78
3. Coculture avec les cardiomyocytes et les neurones ganglionnaires	79
4. Détection de la fusion cellulaire entre cellules hMADS et cardiomyocytes	79
<i>Système Cre/LoxP</i>	79
<i>Marquage au X-Gal</i>	80
5. Marquages des échanges intercellulaires et du transfert de mitochondries	81
6. Estimation du taux de prolifération des progéniteurs murins par comptage cellulaire au MTT.....	81
7. Cellules hMADS et implication du statut du cycle cellulaire dans la reprogrammation des cardiomyocytes.....	82

8. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qRT-PCR)	82
9. Inhibition de la polymérisation des microtubules et de la f-actine	83
10. Evaluation du taux de reprogrammation des cardiomyocytes adultes	84
11. Immunocytochimie	84
12. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) sur les cocultures	85
13. Acquisition des images	85
<i>Microscopie optique</i>	85
<i>Microscopie électronique</i>	86
RESULTATS	88
1. Impact de la coculture sur les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes ...	88
1.1. Echanges de matériel cellulaire et formation de cellules hybrides	88
1.2. Formation et caractéristiques des cellules hybrides issues de la coculture	92
1.3. Origine des progéniteurs cardiaques	98
1.4. Reprogrammation et fusion partielle	102
1.5. Implication des nanotubes dans la fusion partielle et dans la reprogrammation des cardiomyocytes.....	106
1.6. Transfert des mitochondries humaines et reprogrammation	111
2. Analyse du potentiel de reprogrammation des cardiomyocytes par d'autres types cellulaires	115
3. Modulation de la reprogrammation des cardiomyocytes	118
3.1. Importance du cycle cellulaire des cellules hMADS dans la reprogrammation des cardiomyocytes.....	118
3.2. Stade de développement des cardiomyocytes et reprogrammation nucléaire ...	120
4. Extension de la reprogrammation à un autre type de cellules somatiques d'intérêt thérapeutique	121
DISCUSSION	125
PERSPECTIVES	137
BIBLIOGRAPHIE	140
ANNEXE	159
Les cellules souches embryonnaires : aspects éthiques et cadre légal	159
ARTICLE	161

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Ad	Adipocytes	DIC	Contraste interférentiel différentiel
ADN	Acide désoxyribonucléique	Dil-LD	<i>3,3'-dioctadecylindocarbocyanine-low density lipoprotein</i>
ADSC	<i>Adipose-Derived Stromal/Stem Cells</i>	DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
aFABP	<i>Adipocyte fatty acid binding protein</i>	DMSO	Diméthylsulfoxyde
AP-HP	Assistance Publique - Hôpitaux de Paris	EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
ARA2	Antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II	eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger	Fah	Fumarylacétoacétate hydrolase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	FE	Fraction d'éjection
ATP	Adénosine triphosphate	FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	FGF-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>
BET	Bromure d'éthidium	FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>	FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
BMC	<i>Bone marrow cells</i>	Flk-1	<i>Fetal liver kinase 1</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	FSV	Fraction stroma-vasculaire
cellules CA	Cellules à adhésion rapide	β-Gal	Beta-Galactosidase
cellules CS	Cellules à adhésion lente	GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
cellules ES	Cellules souches embryonnaires	GATA-4	<i>GATA binding protein 4</i>
cellules PLA	<i>Processed lipoaspirate cells</i>	Gly-A	Glycophorine A
CFUs-F	<i>Colony forming units-fibroblastic</i>	hBMSC	<i>Human bone marrow-derived multipotent stem cells</i>
CM-Dil	Chlorométhylbenzamide dérivé du Dil	HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	HEK293T	<i>Human embryonic kidney 293T</i>
CpG	Dinucléotides cytidine-guanosine	HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Cre	<i>Causes recombination</i>	HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
CSA	Cellules souches adultes	HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor-1 alpha</i>
CSC	Cellules souches cardiaques	HLA-I	<i>Human leucocyte antigen de classe I</i>
CSH	Cellules souches hématopoïétiques	HLA-DR	<i>Human leucocyte antigen-D related</i>
CSM	Cellules souches mésenchymateuses	hMADS	<i>Human multipotent adipose derived stem cells</i>
cTnl	Sous unité I de la troponine cardiaque	HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
cTnT	Sous unité T de la troponine cardiaque		
Cy-3	Cyanine 3		
Cy-5	Cyanine 5		

HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>	Os	Ostéoblastes
IC	Intracronaire	P4HB	<i>Prolyl four hydroxylase subunit beta</i>
ICC	Immunocytochimie	PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
IDM	Infarctus du myocarde	PBSC	<i>Peripheral blood stem cells</i>
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
IGF-1	<i>Insulin growth factor-1</i>	PFA	Paraformaldéhyde
IL-1 α	Interleukine-1 alpha	pg1-pg6	Pseudogène 1 à 6
IL-6	Interleukine-6	PGF	<i>Placental growth factor</i>
IM	Intramyocardique	PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
IMRB	Institut Mondor de Recherche Biomédicale	qRT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale	RLO	Radicaux libres oxygénés
iPS	<i>Induced pluripotent stem cells</i>	RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>	Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
J	Jour	SDF-1	<i>Stromal-derived factor-1</i>
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>	α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
M	Moles par litre	SMB	<i>Skeletal myoblast</i>
MAPC	<i>Multipotent adult progenitor cells</i>	SNC	Système nerveux central
MCI	Masse cellulaire interne	SOX2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>	SVF	Sérum de veau foetal
mdx	<i>X-linked muscular dystrophy</i>	TAB	Tissu adipeux blanc
MEF-2C	<i>Myocyte enhancer factor-2C</i>	TABr	Tissu adipeux brun
α -MEM	<i>Alpha-modified Eagle's medium</i>	TCF3	<i>Transcription factor 3</i>
MIAMI	<i>Marrow-isolated adult multilineage inducible</i>	TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-beta 1</i>
MO	Moelle osseuse	TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
MRC-5	<i>Medical research council 5</i>	TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium	UV	Ultraviolet
NANOG	<i>Tír na nÓg</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
NOD/SCID	<i>Nonobese diabetic / severe combined immune deficiency</i>	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
NS	Non significatif		
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluoro-méthylbenzoyl)-1,3 cyclohexanedione		
OC	Ostéocalcine		
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>		

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1. Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées dans la génération d'iPS.	26
Tableau 2. Outils thérapeutiques post-infarctus.	51
Tableau 3. Sélection d'essais cliniques de thérapie cellulaire cardiaque.	56
Tableau 4. Liste des amorces utilisées en qRT-PCR.	83
Tableau 5. Liste des anticorps utilisés.	85
Figure 1. Sources de cellules souches humaines au cours de la vie et leur potentiel de différenciation.	16
Figure 2. Dérivation des cellules ES.	18
Figure 3. Réseau de régulation transcriptionnelle des facteurs Oct4, Sox2 et Nanog dans les cellules ES.	20
Figure 4. Signaux externes contribuant à l'autorenouvellement des cellules ES.	22
Figure 5. Stratégies utilisées pour la création d'iPS à partir de cellules somatiques adultes.	25
Figure 6. Représentation d'une niche de cellule souche.	29
Figure 7. Théorie des divisions symétriques et asymétriques.	32
Figure 8. Plasticité des cellules hMADS <i>in vitro</i>	45
Figure 9. Potentiel de régénération des cellules hMADS dans le muscle squelettique de souris mdx.	47
Figure 10. Effets des facteurs paracrines dans la régénération myocardique.	62
Figure 11. Mécanismes connus ou supposés d'apparition de nouveaux phénotypes.	65
Figure 12. La fusion cellulaire.	69
Figure 13. Présentation de l'approche expérimentale et des objectifs de l'étude.	73
Figure 14. Principe de la détection de cellules hybrides issues d'une fusion par le système Cre-LoxP et marquage au X-Gal.	80
Figure 15. Echanges de matériel cytoplasmique entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes entre 6 et 24 heures après l'initiation de la coculture.	88
Figure 16. Echanges de matériel nucléaire entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes entre 6 et 24 heures après l'initiation de la coculture.	89
Figure 17. Echanges bidirectionnels de mitochondries entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes entre 6 et 24 heures après l'initiation de la coculture.	91
Figure 18. Détection des cellules hybrides au sein de la coculture après fusion.	93
Figure 19. Expression de marqueurs cardiomyogéniques précoces par les cellules hybrides.	94
Figure 20. Les cellules hybrides possèdent un phénotype uniquement cardiaque.	95

Figure 21. Cellules hybrides et expression de marqueurs cardiomyogéniques tardifs.	96
Figure 22. Capacité de prolifération des cellules hybrides.	97
Figure 23. Prolifération des progéniteurs au sein de la coculture mesurée par MTT (courbe verte).	98
Figure 24. Reprogrammation des cardiomyocytes mesurée par qRT-PCR.	99
Figure 25. Analyse de l'origine des progéniteurs par immunocytochimie d'une colonie GATA-4 positive après 7 jours de coculture.	100
Figure 26. Importance des contacts cellule-cellule dans la reprogrammation mesurée par qRT-PCR.	101
Figure 27. Taux de survie des cardiomyocytes après dissociation cardiaque.	102
Figure 28. Analyse de la fusion permanente dans les cocultures.	104
Figure 29. Détection de structures de communication intercellulaires permettant une fusion partielle.	105
Figure 30. Implication des filaments de f-actine et des microtubules dans la reprogrammation des cardiomyocytes.	108
Figure 31. Transdifférenciation partielle des cellules hMADS en coculture après exposition aux inhibiteurs de polymérisation des nanotubes.	110
Figure 32. Transfert de mitochondries humaines vers les cardiomyocytes et présence de ces organites dans les progéniteurs cardiaques murins.	112
Figure 33. Rôle du transfert de mitochondries dans la reprogrammation.	114
Figure 34. Caractérisation phénotypique par immunocytochimie des cellules issues de la coculture entre des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et des cardiomyocytes adultes.	115
Figure 35. Comparaison du potentiel de reprogrammation de différents types cellulaires par qRT-PCR.	117
Figure 36. Impact du cycle cellulaire sur l'efficacité de reprogrammation mesurée par qRT-PCR.	119
Figure 37. Effet du stade de développement des cardiomyocytes sur la reprogrammation mesurée par qRT-PCR.	121
Figure 38. Echanges de matériel cytoplasmique entre les cellules hMADS et les neurones adultes de ganglions rachidiens 24 heures après l'initiation de la coculture.	121
Figure 39. Les neurones de ganglions rachidiens adultes seuls n'expriment pas Ki67.	122
Figure 40. La coculture entre les cellules hMADS et les neurones de ganglions rachidiens induit l'apparition de cellules β -III tubuline / Ki67 double positives.	123

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

AVANT-PROPOS

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde avec une estimation de 17,1 millions de décès en 2004 d'après les dernières statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé. D'ici 2030, ce chiffre devrait être en constante augmentation pour atteindre 23,6 millions de décès. Cet accroissement est dû à l'allongement de l'espérance de vie, à l'augmentation des facteurs de risque tels que l'obésité, le diabète et le tabagisme et au manque d'activité physique. En outre ces maladies ne touchent pas que les pays industrialisés et contrairement à une idée reçue, une majorité des malades (80%) est issue de pays à revenu moyen ou faible. Dans ces pays, le manque de prévention et un accès restreint aux services de santé participent grandement à l'augmentation du nombre de décès.

Parmi les maladies cardio-vasculaires, l'infarctus du myocarde (IDM), qui fait partie des cardiopathies coronariennes (7,2 millions de décès en 2004) est l'une des causes majeures de morbidité-mortalité dans les pays développés et émergents. Malgré l'amélioration de sa prise en charge thérapeutique au cours de ces dernières années, on dénombre en France entre 120 000 et 150 000 IDM par an, responsables d'environ 15 000 décès précoces et d'une importante morbidité. L'IDM évolue généralement vers l'insuffisance cardiaque chronique, des problèmes d'arythmies voire même la mort subite.

Une étude sur cohorte menée entre 1996 et 2000 a montré un taux de survie à 5 ans après le diagnostic d'une insuffisance cardiaque de 50% chez les hommes et de 46% chez les femmes (Roger *et al.* 2004). En France, environ 500 000 personnes présentent une insuffisance cardiaque dont la majorité suite à un IDM. On dénombre environ 120 000 nouveaux cas et 32 000 décès chaque année (Delahaye *et al.* 1998), ce qui représente 1 à 2% du total des dépenses de santé (Berry *et al.* 2001).

Malgré l'arsenal thérapeutique actuellement disponible (revascularisation coronaire, traitements pharmacologiques, défibrillateur implantable et stimulation multisite) et les progrès réalisés au cours des dernières décennies dans la prise en charge des patients, le gain en termes de survie reste minime. Lorsque les patients deviennent réfractaires à toutes les thérapeutiques disponibles, la transplantation cardiaque reste l'une des dernières options envisageables. Cependant le manque de donneurs, les complications post-opératoires, le faible taux de survie et les coûts économiques

engendrés mettent l'accent sur la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Mon laboratoire d'accueil se propose d'utiliser des cellules souches adultes dérivées du tissu adipeux humain, les cellules hMADS (*human Multipotent Adipose Derived Stem Cells*) pour régénérer le muscle cardiaque infarci. Les premiers travaux ont consisté à injecter ces cellules souches adultes indifférenciées dans des cœurs de souris après une ischémie de l'artère coronaire gauche de 90 minutes. Dans ce modèle, aucune régénération cardiaque n'a pu être observée, due essentiellement à une mortalité massive et précoce des cellules injectées. Pour augmenter le potentiel cardiomyogénique des cellules hMADS, nous avons décidé d'exploiter leur propriété de fusion, antérieurement mise en évidence dans le muscle squelettique d'un modèle murin de la myopathie de Duchenne (Rodriguez *et al.* 2005b). Pour se faire nous avons développé un modèle de coculture *in vitro* entre les cellules souches adultes humaines et des cardiomyocytes murins adultes post-mitotiques.

Mon travail de thèse a eu pour objectif d'analyser les modalités de fusion entre les cellules souches du tissu adipeux humain et des cardiomyocytes murins adultes afin de mieux comprendre si et comment ce phénomène peut jouer un rôle dans la réparation tissulaire médiée par les cellules souches. Dans un premier temps nous avons caractérisé les modalités de fusion et le phénotype des cellules hybrides résultantes puis dans un deuxième temps nous avons tenté d'augmenter la survenue de ce phénomène en vue d'améliorer le potentiel thérapeutique des cellules obtenues.

En introduction de ce manuscrit, j'aborderai les cellules souches dans leur ensemble en partant des cellules souches embryonnaires pour finir par les cellules souches adultes avec un intérêt particulier pour les cellules souches adultes du tissu adipeux. Puis je présenterai brièvement l'IDM, sa prise en charge et ses conséquences histopathologiques. Enfin je m'intéresserai aux différentes cellules utilisées dans la thérapie cellulaire cardiaque et aux mécanismes de régénération déployés par les cellules souches adultes au cours de la régénération myocardique.

1. Les cellules souches

1.1. Définition de la cellule souche

Le concept de cellules souches regroupe une grande quantité de populations de cellules très différentes tant au niveau de leur origine que de leur morphologie ou de leurs propriétés biologiques et fonctionnelles. Cette diversité entraîne une certaine confusion dans les termes utilisés pour les définir ainsi que dans les attributs qu'elles doivent posséder pour mériter la dénomination de "cellules souches". Néanmoins il existe une définition comprenant trois caractéristiques communes considérées comme essentielles pour qu'une cellule soit considérée "souche" (Verfaillie 2002).

Premièrement les cellules souches doivent être des cellules indifférenciées capables de s'autorenouveler à l'infini. La cellule souche se divise essentiellement de façon asymétrique, donnant au moins une cellule fille identique à la cellule d'origine qui conserve toutes ses propriétés génétiques et épigénétiques. Cette caractéristique assure le maintien ou l'amplification du réservoir de cellules souches.

Deuxièmement, les cellules souches doivent posséder la capacité de se différencier en un ou plusieurs types de cellules matures. La génération de cellules spécialisées est le résultat :

(i) d'une étape de différenciation représentant un changement qualitatif du phénotype cellulaire (morphologie, composition protéique) après un changement du génotype de la cellule,

(ii) d'une étape de maturation par une modification quantitative du phénotype (accumulation des protéines apparues lors de la différenciation),

(iii) d'une étape de prolifération par division cellulaire (Potten et Loeffler 1990).

Troisièmement, la dernière caractéristique de la cellule souche est sa capacité à reconstituer *in vivo* un tissu par des cellules fonctionnelles. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui sont les cellules souches adultes (CSA) les plus étudiées, représentent un bel exemple de reconstitution d'un tissu. En effet, ces cellules sont capables après transplantation chez un receveur ayant subi une ablation médullaire, de repeupler son système hématopoïétique par des cellules matures de toutes les lignées sanguines (Bhatia *et al.* 1997).

1.2. Les différents types de cellules souches

Sur les bases de cette première définition, il existe différents types de cellules souches qui se distinguent essentiellement en fonction de leur origine mais également de leur potentiel de différenciation et de prolifération. A l'exception des cellules souches pluripotentes induites ou iPS (*induced pluripotent stem cells*) qui sont des cellules somatiques modifiées que l'on reprogramme vers un stade plus précoce, il existe une relation entre le potentiel de différenciation et l'âge d'un individu (Figure 1). Bien que formellement non démontré, on peut imaginer que plus l'âge avance, plus les capacités de différenciation des cellules souches d'un individu diminuent.

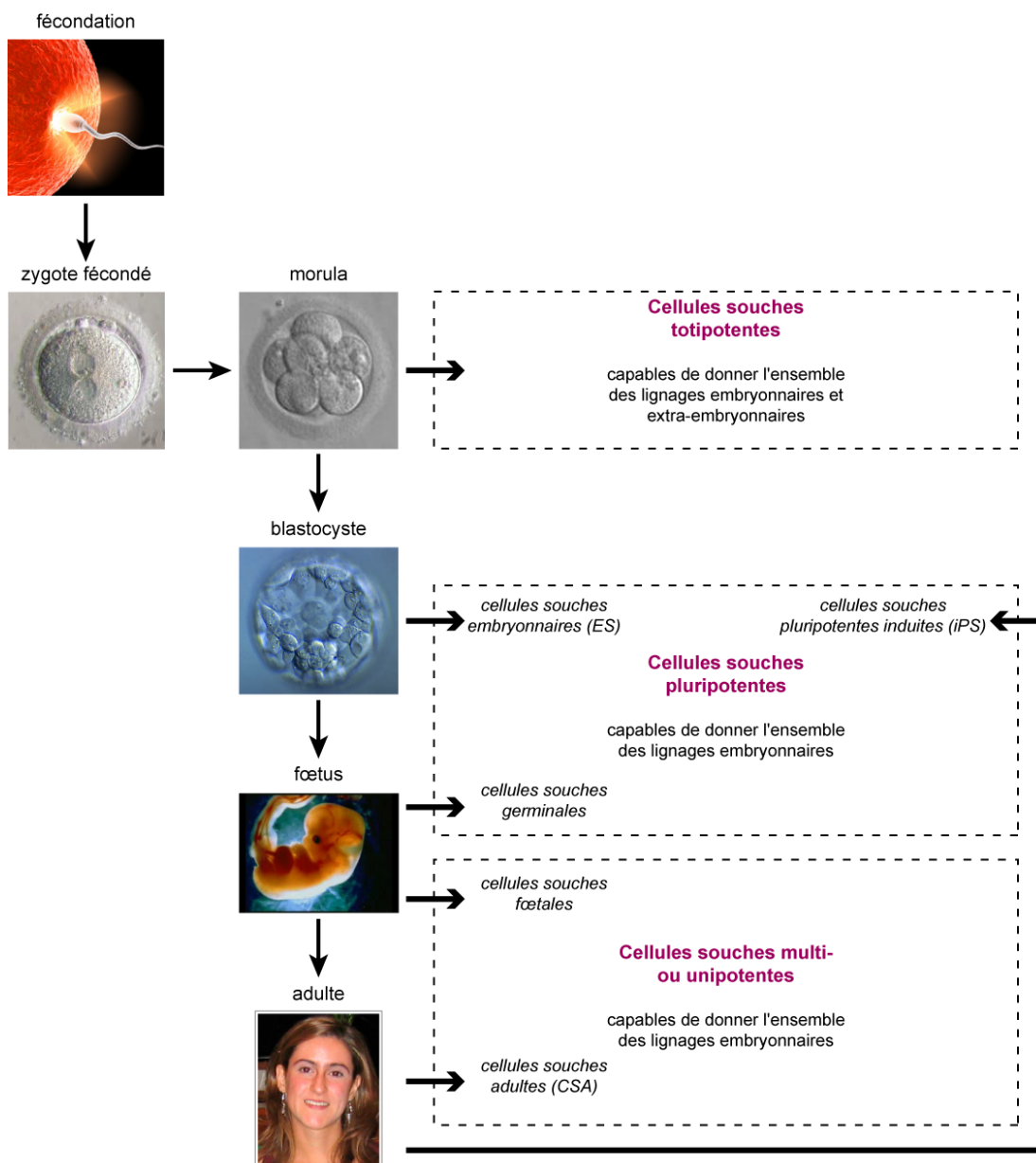


Figure 1. Sources de cellules souches humaines au cours de la vie et leur potentiel de différenciation.

Les cellules souches totipotentes ne sont présentes que jusqu'au quatrième jour après fécondation (stade morula). Ces cellules sont potentiellement capables de donner l'ensemble des lignages embryonnaires et extra-embryonnaires du corps humain comme en atteste la naissance de jumeaux monozygotes bichorioniques qui sont issus du même œuf mais qui possèdent des placentas distincts.

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont dérivées à partir de l'embryon au stade blastocyste et sont dites pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent donner tous les lignages embryonnaires, mais pas les annexes extra-embryonnaires (cordon ombilical et placenta) du corps humain. Un peu plus tard dans la différenciation du fœtus (entre la cinquième et la neuvième semaine de gestation), on trouve les cellules souches germinales qui sont issues des crêtes génitales et qui sont également considérées comme pluripotentes (Kerr *et al.* 2006). Enfin, il est désormais possible de générer artificiellement des cellules souches pluripotentes par transfert nucléaire, par fusion cellulaire ou par reprogrammation directe à partir de cellules somatiques (Jaenisch 2009). Dans ce dernier cas, qui est le plus utilisé et le plus prometteur, on parle de cellules souches pluripotentes induites ou iPS (*induced pluripotent stem cells*). Les autres types de cellules souches retrouvées dans l'embryon, dans le fœtus ou chez l'adulte sont qualifiés de multipotentes ou unipotentes. Leurs capacités de prolifération à l'état indifférencié et de différenciation sont moindres que celles des cellules souches pluripotentes. Cependant ce groupe de cellules est très hétérogène et contient des types cellulaires dont certaines caractéristiques peuvent être très similaires à celles des cellules souches pluripotentes et d'autres très éloignées. Les cellules souches fœtales et adultes sont classées dans cette catégorie.

Dans la suite de ce manuscrit, je présenterai brièvement les caractéristiques des cellules ES, des iPS et des CSA multipotentes puis je soulignerai les mécanismes mis en jeu et leur intérêt dans la thérapie cellulaire cardiaque.

1.3. Les cellules souches embryonnaires (ES)

Les cellules ES ont d'abord été isolées pour la première fois chez la souris en 1981 (Evans et Kaufman 1981; Martin 1981) puis chez l'homme en 1998 (Thomson *et al.* 1998). Ces cellules sont produites par un processus appelé dérivation qui consiste à isoler les cellules de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste entre 5 jours ½ et 7 jours ½ après la fécondation chez l'homme (Figure 2). La masse cellulaire interne composée d'une

centaine de cellules, est à l'origine de toutes les lignées somatiques et germinales de l'embryon.

Comme évoqué dans l'introduction, les cellules ES ont la propriété de générer des cellules différenciées de théoriquement tous les types cellulaires d'un organisme en contribuant aux trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme, à la fois *in vitro* et *in vivo*. La pluripotence des cellules ES a été démontrée *in vivo* par injection dans des blastocystes. Leur contribution à la formation de tous les tissus de l'embryon a été montrée, notamment pour les lignées germinales permettant la transmission de leurs caractéristiques à la descendance. Cette propriété a été largement exploitée pour étudier la fonction de gènes *in vivo* après leur mutation (van der Weyden *et al.* 2002).

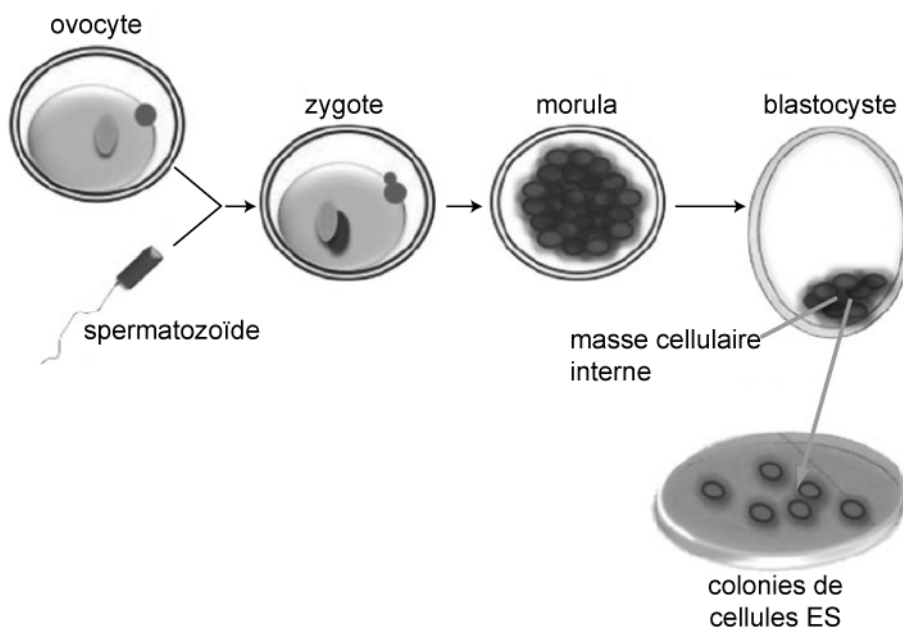


Figure 2. Dérivation des cellules ES. Adapté de (Tomazou et Meissner 2010).

1.3.1. Mécanismes de préservation de la pluripotence des cellules ES

Aujourd'hui les mécanismes qui permettent le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement des cellules ES commencent à être bien connus. De manière schématique, ces mécanismes de régulation sont classés en fonction de leurs niveaux d'intégration.

Régulation génique

Le premier échelon se situe au niveau génique. Les trois gènes les plus importants de la pluripotence sont OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*), NANOG (*Tír na nÓg*, terre de l'éternelle jeunesse dans la mythologie celtique), et SOX2 (*Sex determining region Y-box 2*). OCT4 et NANOG sont des facteurs de transcription qui sont exprimés très tôt dans le développement embryonnaire (Mitsui *et al.* 2003; Nichols *et al.* 1998). L'expression de ces gènes est finement régulée puisqu'une dérégulation négative des niveaux d'expression d'OCT4 et de NANOG entraîne respectivement une différenciation en trophoctoderme et endoderme des cellules du blastocyste et des cellules ES (Chambers *et al.* 2003; Mitsui *et al.* 2003; Nichols *et al.* 1998; Niwa *et al.* 2000). A contrario, la surexpression d'OCT4 induit une différenciation en endoderme et mésoderme (Niwa *et al.* 2000) et celle de NANOG induit une différenciation en ectoderme des cellules ES (Darr *et al.* 2006). OCT4 a également été montré comme formant un complexe protéique avec SOX2 modulant l'expression de nombreux gènes dans les cellules ES murines (Botquin *et al.* 1998; Nishimoto *et al.* 1999). Le rôle de SOX2 dans la pluripotence a été définitivement mis en évidence par son inactivation dans des cellules ES murines qui a entraîné une différenciation en de nombreux lignages (Ivanova *et al.* 2006). Boyer *et al.* (Boyer *et al.* 2005) ont montré que NANOG, SOX2 et OCT4 occupaient simultanément de nombreux promoteurs de gènes, y compris les leurs. Ces trois facteurs forment donc un circuit de régulation transcriptionnelle capable de s'autoréguler, d'activer la transcription de gènes impliqués dans la pluripotence et de réprimer des gènes du développement dans les cellules ES humaines (Figure 3). Enfin ces facteurs de transcription ont de nombreux autres partenaires coactivateurs de la pluripotence et corépresseurs de la différenciation formant un vaste réseau régulateur (Masui 2010). D'autres facteurs de transcription interagissant ou non avec le trio cité ci-dessus ont montré une importance certaine dans le maintien de l'intégrité des cellules ES. Parmi les plus étudiés on peut citer, KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) (Nakatake *et al.* 2006), TCF3 (*Transcription factor 3*) (Pereira *et al.* 2006) ou encore la famille des MYC (Cartwright *et al.* 2005).

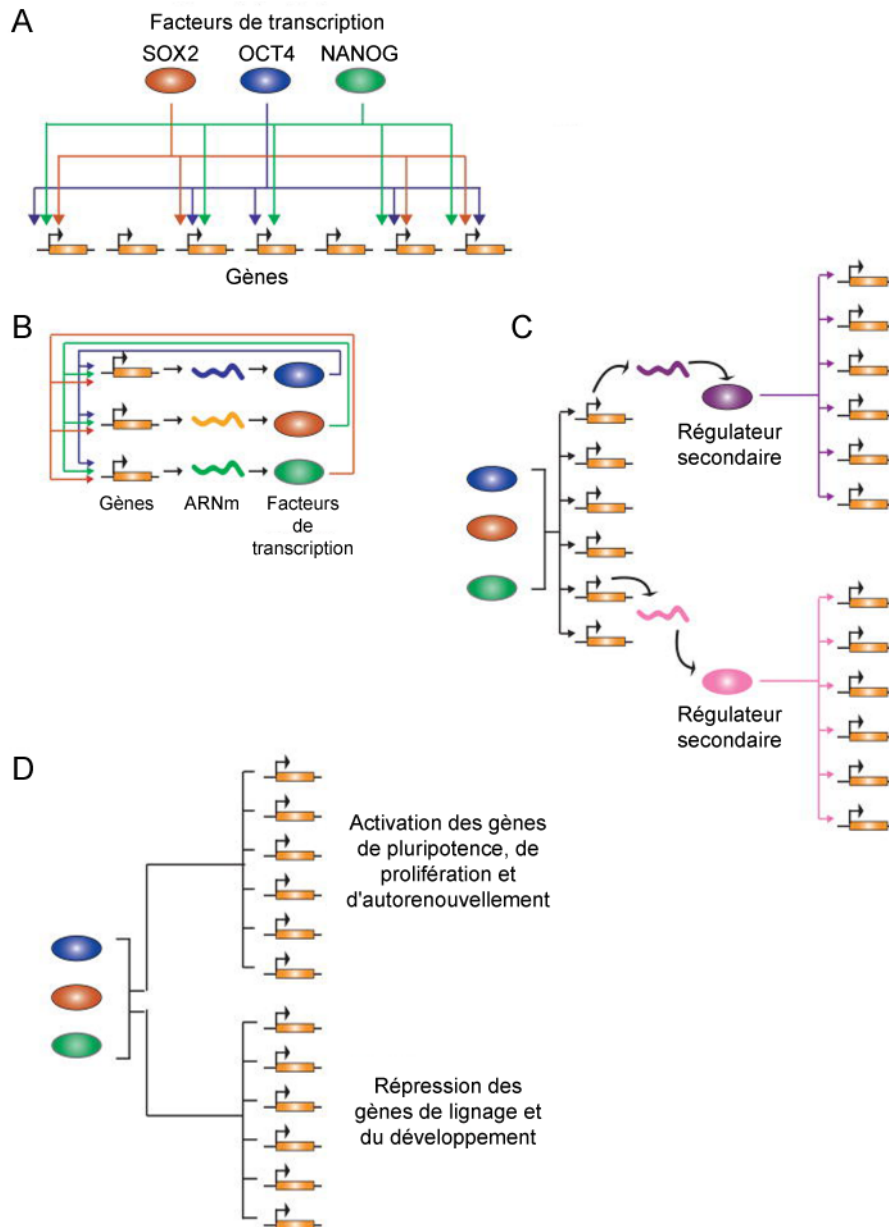


Figure 3. Réseau de régulation transcriptionnelle des facteurs Oct4, Sox2 et Nanog dans les cellules ES. (A) Les régulateurs OCT4, SOX2 et NANOG ciblent en majorité les mêmes gènes. (B) Boucle d'autorégulation des facteurs de transcription OCT4, SOX2 et NANOG. (C) OCT4, SOX2 et NANOG régulent d'autres facteurs de transcription (régulateurs secondaires) qui à leur tour régulent plusieurs gènes. Le réseau de régulation ainsi créé permet un contrôle sur un grand nombre de gènes. (D) Les promoteurs activés par OCT4, SOX2 et NANOG dans les cellules ES appartiennent à des gènes impliqués dans la pluripotence et l'autorenouveaulement alors que les promoteurs réprimés codent pour des gènes impliqués dans la différenciation et le développement.

Ovales colorés : protéines ; rectangles oranges : gènes.

Adapté de (Cole et Young 2008).

L'autre processus de régulation génique apparu récemment comme un nouveau groupe de régulateurs post-traductionnels intervenant dans les cellules de mammifères concerne les microARNs (Farh *et al.* 2005). Le rôle de ces microARNs dans la pluripotence a été établi en découvrant que des cellules ES présentant une déficience en DICER, une protéine nécessaire à la maturation des microARNs, ne proliféraient et ne se différenciaient pas correctement (Murchison *et al.* 2005). Plus récemment, il a été découvert que les facteurs de pluripotence NANOG, OCT4 et SOX2 jouaient un rôle important dans la régulation des microARNs exprimés dans les cellules ES à l'état indifférencié. Parmi les clusters de microARNs impliqués dans le maintien de la pluripotence, miR-290-295 chez la souris et son homologue miR-302 chez l'homme semblent avoir un rôle prépondérant (Marson *et al.* 2008).

Régulation épigénétique

Le deuxième niveau de régulation est de type épigénétique. L'épigénétique représente l'ensemble des changements héréditaires et réversibles dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence ADN. Les deux mécanismes principaux de régulation épigénétique sont les modifications post-traductionnelles des histones (Kouzarides 2007) et la méthylation des dinucléotides cytosine-guanine (îlots CpG) (Klose et Bird 2006).

Les cellules ES ont un profil riche en euchromatine, la forme relâchée de l'ADN (Meshorer et Misteli 2006). Cet état décondensé est à mettre en relation avec des niveaux élevés de plusieurs facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, qui par leur activité enzymatique jouent sur la conformation générale de la chromatine (Li *et al.* 2007).

Lors du processus de différenciation, la chromatine a tendance à se condenser et à former de l'hétérochromatine, réprimant ainsi des gènes non impliqués dans le lignage spécifié. Cette condensation/décondensation est sous le contrôle d'une part des facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants et d'autre part des histones, protéines structurales qui modifient l'architecture locale de la chromatine. A l'état indifférencié, les histones sont hyperacétylées et méthylées sur des résidus lysine spécifiques. De plus l'accès à la transcription des gènes cibles est facilité par une absence de méthylation des îlots CpG répartis au sein de séquences répétées ainsi que sur certains promoteurs (notamment OCT4 et NANOG) (Lessard et Crabtree 2010). En cas de différenciation cellulaire, des déacétylases et des déméthylases pour les histones et des méthyltransférases pour les îlots CpG permettent la compaction de la chromatine et

favorisent l'expression de gènes de différenciation au détriment de gènes impliqués dans l'autorenouvellement et le maintien de l'état indifférencié.

Régulation par des facteurs extrinsèques

Le dernier niveau de régulation se fait par des facteurs extrinsèques. Ces facteurs entraînent l'activation de voies de signalisation intracellulaires spécifiques qui permettent à la cellule de répondre et de s'adapter à un moment donné à des signaux paracrines issus de son microenvironnement. Ces voies de signalisation couplent une information extracellulaire avec un réseau génique et épigénétique qui vont moduler l'état d'indifférenciation et d'autorenouvellement de la cellule. Les ligands spécifiques peuvent être des facteurs de croissance, des cytokines ou des hormones qui vont activer ces voies de signalisation pour initier des cascades de transduction en un ou plusieurs points d'entrée. Les voies les plus importantes sont résumées dans la Figure 4.

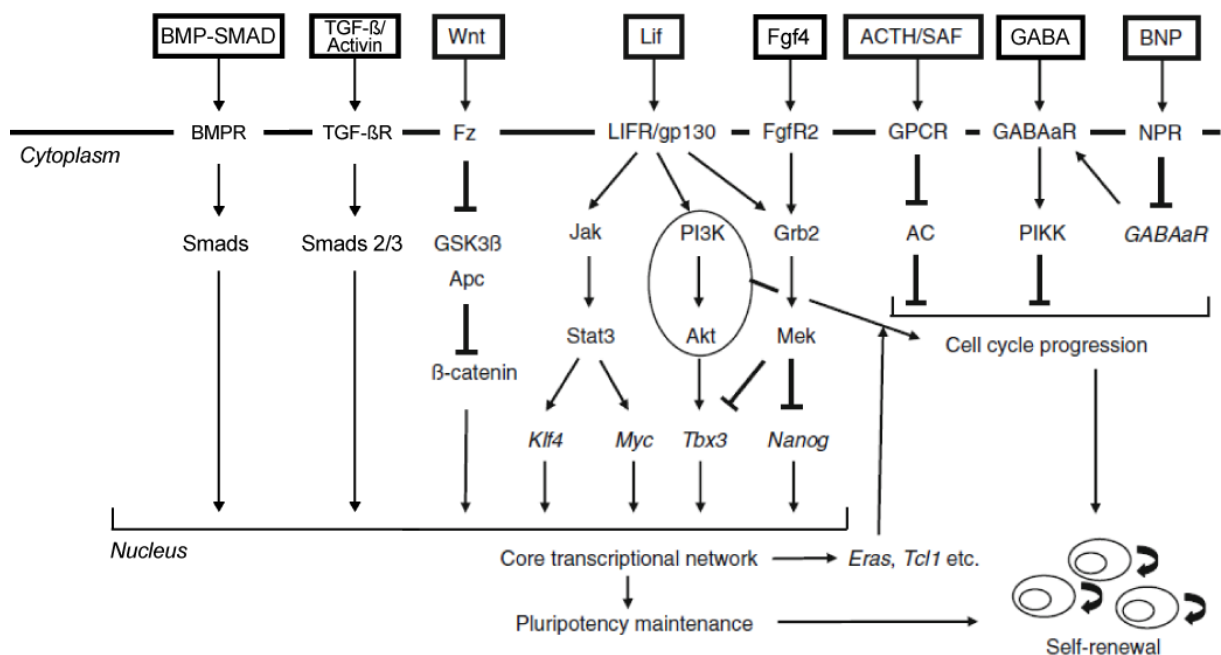


Figure 4. Signaux externes contribuant à l'autorenouvellement des cellules ES. Adapté de (Masui 2010) et (Sumer *et al.* 2010).

1.3.2. Induction de la pluripotence par reprogrammation nucléaire

Depuis plusieurs décennies, les scientifiques se sont interrogés sur la possibilité de réjuvener une cellule et de recréer une cellule toti- ou pluripotente à partir d'une cellule

différenciée par reprogrammation nucléaire de celle-ci. L'induction de la reprogrammation peut se faire par transfert nucléaire, par l'utilisation d'extraits, par fusion cellulaire forcée ou par introduction de gènes impliqués dans la pluripotence.

Transfert nucléaire

Les travaux de John Gurdon (Gurdon et Uehlinger 1966) ont permis de mettre en évidence la possibilité de produire des adultes fertiles de *xenopus laevis* après transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé. Ces travaux ont démontré d'une part la faisabilité de "réverser" le destin d'une cellule différenciée et d'autre part que l'ovocyte contenait les facteurs nécessaires à la reprogrammation du noyau somatique. Il a fallu attendre environ trois décennies pour voir le premier mammifère naître par transfert nucléaire (Wilmut *et al.* 1997). Malgré les avancées technologiques et les progrès dans la compréhension des phénomènes régissant la reprogrammation, l'efficacité de cette technique reste très faible. Ces mauvais rendements ont été attribués à une reprogrammation incomplète du génome de la cellule somatique durant les premiers stades cellulaires (Page *et al.* 2011).

Reprogrammation par extraits

De la même manière que le cytoplasme de l'ovocyte contient les facteurs nécessaires à la reprogrammation, des extraits cellulaires variés ont été utilisés pour reprogrammer des cellules somatiques (Condorelli *et al.* 2001; Freberg *et al.* 2007; Hakelien *et al.* 2002; Hansis *et al.* 2004). L'ensemble de ces expériences a permis de mieux comprendre les modifications épigénétiques et l'activation transcriptionnelle intervenant dans le noyau somatique lors de sa reprogrammation (Bru *et al.* 2008; Kimura *et al.* 2004). Malgré des progrès dans la caractérisation de certains mécanismes, les grandes quantités d'extraits cellulaires nécessaires et la faible efficacité du processus de reprogrammation n'ont pas permis une démocratisation de cette méthode.

Reprogrammation par fusion cellulaire forcée

La reprogrammation du noyau d'une cellule somatique a également été réalisée par fusion *in vitro* avec des cellules ES de la même espèce (Cowan *et al.* 2005) ou entre cellules ES murines et fibroblastes humains (Bhutani *et al.* 2010). Le premier modèle a montré que des facteurs contenus dans les cellules ES non seulement maintiennent l'état d'indifférenciation, mais surtout sont capables de l'induire à partir de cellules différenciées. Dans le modèle inter-espèces, les hétérokaryons formés ne se divisent plus,

ne répliquent plus leur ADN et expriment les formes humaines de OCT4 et de NANOG après déméthylation de l'ADN du noyau somatique soulignant une fois de plus l'importance du contrôle épigénétique et de l'expression des gènes de pluripotence dans la reprogrammation.

Reprogrammation par introduction de gènes

En 2006, Takahashi et Yamanaka ont proposé une méthode de reprogrammation directe par transduction de quatre rétrovirus contenant les gènes OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC dans des fibroblastes murins (Takahashi et Yamanaka 2006). Les cellules obtenues, dont la pluripotence a été induite ont été baptisées iPS pour *induced pluripotent stem cells*. Après quelques mises au point et améliorations, ce principe a été adapté aux cellules humaines en transduisant des fibroblastes du derme avec la même combinaison de gènes (Takahashi *et al.* 2007). Dans cette étude, les iPS ne présentent aucune différence notable avec les cellules ES humaines en terme de morphologie, de différenciation et de taux de prolifération. Elles sont notamment capables de se différencier en cellules des trois feuilletts embryonnaires *in vitro* et de former des tératomes *in vivo*.

Malgré ce progrès majeur dans le domaine de la reprogrammation, l'utilisation de rétrovirus qui vont s'intégrer dans le génome de la cellule hôte augmente le risque d'instabilité génomique pouvant conduire à la tumorigenèse. Après injection d'iPS murines dans des blastocystes, des tumeurs sont apparues dans les souris chimériques notamment après la réactivation du rétrovirus contenant l'oncogène *c-Myc* (Okita *et al.* 2007). L'autre point faible de cette méthode est son efficacité. Mali *et al.* ont estimé l'efficacité de reprogrammation des fibroblastes humains en iPS à environ 1 cellule sur 10 000 soit 0,01% (Mali *et al.* 2008).

C'est dans l'optique de diminuer les risques de tumorigenèse et d'augmenter l'efficacité de transduction que de nombreuses équipes s'attachent à trouver de nouvelles méthodes pour créer des iPS. Les aspects les plus étudiés concernent l'utilisation de nouvelles stratégies permettant de s'affranchir de virus intégratifs et l'optimisation dans le choix de la cellule somatique à reprogrammer. Les méthodes utilisées à ce jour sont présentées dans la Figure 5. Leurs avantages et inconvénients respectifs sont résumés dans le Tableau 1. Parmi ces nouvelles techniques, le rôle des microARNs est à nouveau sur le devant de la scène. En effet après la publication de travaux montrant l'importance de ces microARNs dans le maintien de la pluripotence, de nombreux auteurs se sont attelés à étudier la fonction de ces molécules dans la reprogrammation directe. Très récemment, et malgré les inconvénients décrits par Lai *et al.* (absence de spécificité, cible non accessible

car trop en amont de la voie de signalisation et expression mal contrôlée après l'induction (Lai *et al.* 2011)), une nouvelle voie de reprogrammation vient d'être publiée, basée sur l'utilisation du cluster miR-302/367 pour la génération d'iPS à partir de cellules somatiques humaines et murines. En effet l'efficacité de reprogrammation de ce cluster sur des fibroblastes embryonnaires de souris et des fibroblastes humains a été cent fois plus importante qu'avec la méthode standard de Yamanaka *et al.* et le délai avant l'expression du marqueur de pluripotence OCT4 a été plus court (Anokye-Danso *et al.* 2011). Les mécanismes sous jacents à cette reprogrammation ne sont pas encore élucidés étant donné que le cluster miR302/367 a probablement pour cible des centaines d'ARNm dont certains régulant le remodelage de la chromatine et la prolifération cellulaire comme prédit par des modèles informatiques (Betel *et al.* 2008).

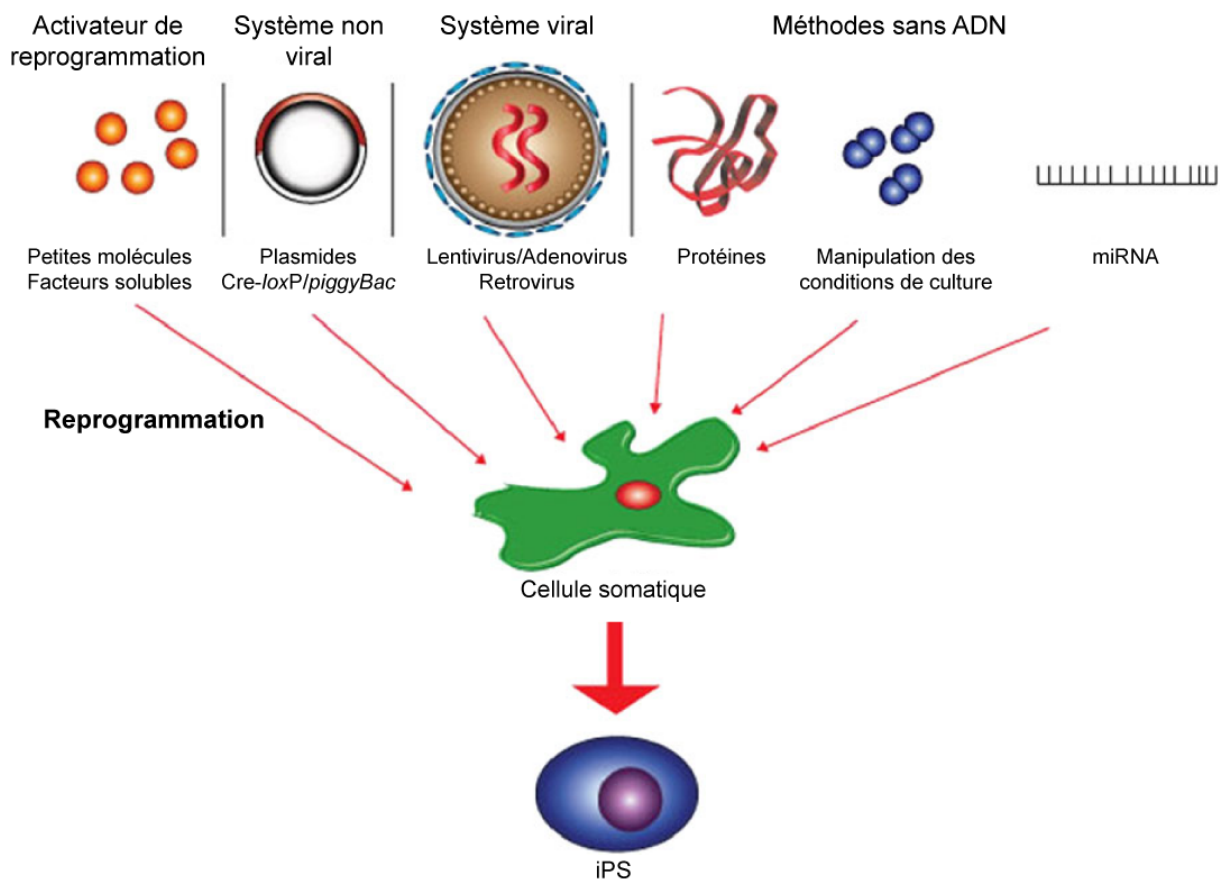


Figure 5. Stratégies utilisées pour la création d'iPS à partir de cellules somatiques adultes.

Adapté de (Lai *et al.* 2011)

Méthodes	Type	Sous-types	Avantages et inconvénients
Méthodes par transfert de gènes	Système viral	Lentivirus	Avantages - Infecte les cellules en division et quiescentes - Les recombinants peuvent être pseudotypés pour un tropisme plus large - Hautement efficace - Expression constitutive ou inducible Inconvénient - Intégration dans le génome de l'hôte
		Retrovirus	Avantages - subit un silencing dans les cellules ES - Hautement efficace Inconvénient - Intégration dans le génome de l'hôte
		Adenovirus	Avantage - Vecteur non intégratif Inconvénients - Transfert de gènes limité - Difficulté à contrôler le niveau d'expression
	Système non-viral	Plasmides épisomaux	Avantages - Vecteur non intégratif - L'autoréplication permet une expression prolongée Inconvénient - Efficacité de reprogrammation faible
		Stratégies d'excision	Cre- <i>loxP</i>
	Transposon piggyBac		Avantages - Auto-excision - Excision précise et efficace Inconvénient - Le gène pBt peut rester actif après la transposition
Méthodes sans ADN	Protéines	Etiquette peptidique poly-arginine	Avantage - Les fibroblastes embryonnaires reprogrammés sont similaires aux cellules ES classiques Inconvénients - Efficacité sur des cellules adultes mal définie - Demi-vie courte
	Manipulation des conditions de culture des cellules	Niveau d'oxygène	Avantages - Pas de manipulation génétique - Pas de transporteurs protéiques requis Inconvénient - Induction de court terme
	MicroARNs	miR-294, miR-302	Avantages - Peuvent remplacer <i>c-Myc</i> - Efficacité améliorée Inconvénients - Non spécifique - La cible peut se trouver trop en amont dans la voie de signalisation - Expression mal contrôlée après l'induction
Amélioration de l'efficacité de reprogrammation	Petites molécules et facteurs solubles	Modification de la chromatine	Avantages - Modulation des modifications de la chromatine - Cible les voies de signalisation cellulaire Inconvénients - Action non spécifique et très large - Peut causer une dérégulation de l'expression génique

Tableau 1. Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées dans la génération d'iPS. Adapté de (Lai *et al.* 2011).

1.4. Les cellules souches adultes (CSA)

Dans l'organisme, il existe un équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire qui assure le maintien des fonctions tissulaires. Cet équilibre est rendu possible entre autre par la contribution d'une population de cellules souches dites adultes dont la fréquence est faible dans l'ensemble des organes. A l'heure actuelle, de nombreux types de CSA ont été identifiés dans une grande variété de tissus. En plus des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivées de la moelle osseuse (MO) et très étudiées, d'autres types de CSA ont été isolés à partir de nombreux tissus ou organes comme l'endothélium, la peau, le tissu adipeux, le tractus gastro-intestinal, le foie, le poumon, le système nerveux central (SNC), le cœur ou encore le muscle squelettique (Barrilleaux *et al.* 2006; Mimeault et Batra 2006; Mimeault et Batra 2008; Mimeault *et al.* 2007; Sell 2005).

1.4.1. Difficultés de caractérisation des CSA

Le terme de CSA fait référence à des populations cellulaires très hétérogènes tant au niveau de leur capacité d'autorenouvellement que de différenciation. Les CSA englobent des cellules souches qui peuvent être "quasi-ES", dotées d'une très grande plasticité et d'un potentiel d'autorenouvellement quasi-illimité et des cellules unipotentes qui se différencient en un seul type cellulaire et dont la capacité de prolifération est très limitée.

Actuellement, la classification des différentes populations de cellules souches reste difficile et peut entraîner un certain nombre de confusions dues au fait qu'aucun marqueur spécifique de CSA n'a à ce jour été identifié, que ce soit l'expression d'un marqueur de surface ou d'un gène particulier. En l'absence de marqueurs spécifiques, de nombreux auteurs cherchent à caractériser les CSA suivant un profil d'expression de plusieurs marqueurs. Chaque expérimentateur définit ses propres critères d'évaluation ce qui ne facilite pas la classification. De plus, il est possible que les populations de progéniteurs et de précurseurs qui dérivent des CSA, considérées comme des contaminants lors de l'isolement, expriment des marqueurs communs avec ces dernières, compliquant ainsi l'isolement et l'enrichissement des CSA.

La localisation et la quantité des cellules souches au sein des tissus sont mal définies. Néanmoins, il est maintenant admis que les CSA résident au sein d'un microenvironnement ou niche, constituée de cellules stromales, d'une matrice extracellulaire renfermant des facteurs solubles et de connexions neurales et sanguines

ayant un contrôle sur le destin des cellules souches. Malgré des avancées importantes dans la caractérisation de la niche de certains tissus tels que la MO (Yin et Li 2006; Zhang *et al.* 2003), la peau (Fuchs 2007), l'intestin (Barker *et al.* 2007; Mills et Gordon 2001), le système nerveux central (Shen *et al.* 2004) ou le muscle (Kuang *et al.* 2007), la composition et la localisation anatomique de cette structure restent mal connues pour de nombreux autres tissus. En outre, en conditions d'homéostasie, la plupart des niches maintient les CSA à l'état de quiescence ce qui rend leur étude *in vivo* difficile.

Lorsque la niche est stimulée par des signaux de danger tissulaire, les CSA vont entamer un processus de prolifération, de différenciation et de maturation pour donner naissance à des cellules matures (tout en maintenant le stock de cellules indifférenciées). Ce processus fait intervenir de nouvelles populations cellulaires appelées progéniteurs et précurseurs qui sont des intermédiaires entre la cellule souche immature et les nombreuses cellules matures qui en dérivent. Ces populations de progéniteurs et de précurseurs (phénotypiquement très variées et en quantité importante) prolifèrent de manière importante puis en s'engageant progressivement vers une voie de différenciation, perdent graduellement leurs capacités d'autorenouvellement et de différenciation au profit d'une spécialisation tissulaire.

Au vu de la difficulté d'étudier *in vivo* les CSA, l'isolement et l'amplification *in vitro* restent les moyens les plus utilisés pour purifier et caractériser une population cellulaire. Or la culture *in vitro* signifie la perte du microenvironnement tissulaire donc potentiellement, la modification des propriétés des CSA au niveau de l'expression de marqueurs ou de leurs caractéristiques d'autorenouvellement. Par ailleurs, les conditions de culture varient fréquemment d'un laboratoire à l'autre (pourcentage de sérum, milieu de culture, pression partielle en oxygène et cocktails de cytokines). Il est légitime de penser que toutes ces variations modifient les propriétés et même les capacités des cellules isolées.

L'ensemble de ces données montre donc à quel point il est difficile d'établir une classification et une hiérarchisation des CSA en fonction de leur immaturité et de leurs propriétés.

1.4.2. Autorenewement, quiescence et durée de vie des CSA

Chez l'homme, la quantité de CSA et leur localisation à l'intérieur des tissus et des organes sont encore mal connues. Néanmoins la notion de niche, en tant que microenvironnement fonctionnel spécifique des cellules souches a été proposée dès 1978 par Schofield qui l'a définie comme un emplacement anatomique spécialisé où, en

association avec d'autres cellules, l'autorenouvellement de la cellule souche hématopoïétique est assuré (Schofield 1978). Cependant, contrairement aux cellules souches pluripotentes, les CSA ont une durée de vie limitée et peuvent être la cible de nombreux évènements qui vont avoir une influence sur leur durée de vie

Le concept de niche

L'hypothèse soulevée par Schofield a depuis été vérifiée *in vivo*, tout d'abord au niveau des lignées germinales des invertébrés *Drosophila melanogaster* (Xie et Spradling 2000) et *Caenorhabditis elegans* (Kimble et White 1981) puis chez les mammifères. Malgré un degré de complexité plus important chez ces derniers, il apparaît que les structures anatomiques fondamentales et les voies de signalisation opérant dans les niches sont très conservées entre espèces. Les éléments récurrents de la niche sont (Figure 6) :

- (i) des composants de la matrice extracellulaire,
- (ii) un support de cellules stromales,
- (iii) des vaisseaux sanguins,
- (iv) des connexions neuronales favorisant la mobilisation des cellules souches hors de la niche.

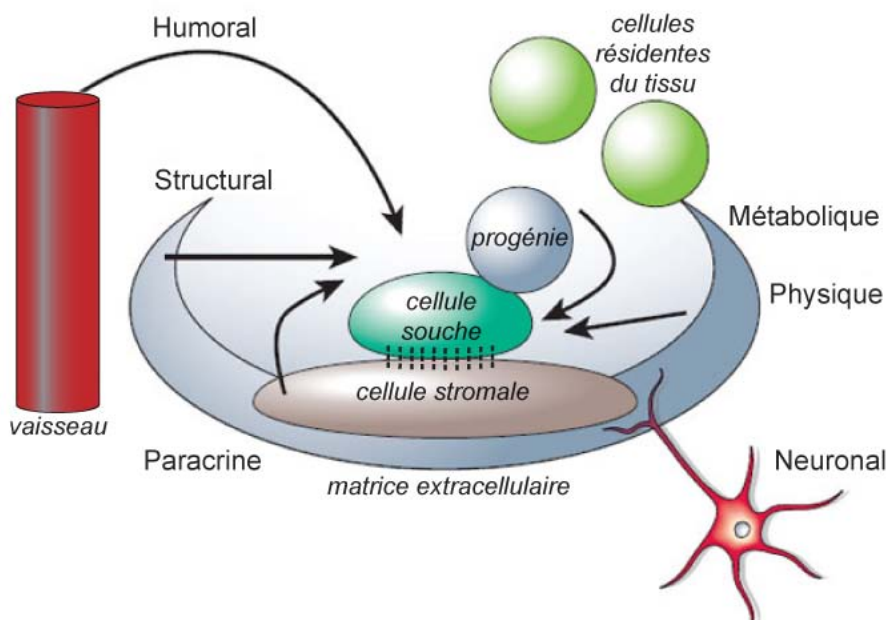


Figure 6. Représentation d'une niche de cellule souche. La niche est le lieu de rencontre de signaux humoraux, architecturaux, paracrines, neuronaux, métaboliques et physiques qui vont réguler le destin de la cellule souche. Adapté de (Scadden 2006).

La matrice extracellulaire agit comme un maillage dans lequel les CSA, les cellules stromales et des signaux moléculaires sont imbriqués. Sa fonction est d'interagir physiquement avec la cellule souche afin de la maintenir dans sa position (ancrage), d'adresser des signaux et de créer des gradients de concentration en cytokines et facteurs de croissance qui vont guider la cellule souche dans ses processus d'autorenouvellement ou de différenciation.

Les cellules stromales assurent également la sécrétion de facteurs paracrines contrôlant le destin des CSA. L'adhésion de la cellule stromale à la cellule souche se fait par des interactions cellule-cellule de type protéiques.

Les vaisseaux transportent vers la niche des nutriments et des signaux systémiques venant d'autres organes et participent au recrutement des cellules souches circulantes vers et en provenance de la niche.

Enfin **les connexions neuronales** favorisent la mobilisation des cellules souches hors de leur niche et intègrent aussi des signaux en provenance d'autres organes par effet neuro-endocrine.

L'étude des niches a permis de mettre en évidence d'une part la flexibilité et l'adaptabilité des CSA et d'autre part le dynamisme de la niche elle-même. En effet après une déplétion en cellules souches, la niche testiculaire de la drosophile est capable d'attirer une cellule somatique et d'induire la dédifférenciation de celle-ci pour remplacer la cellule souche initiale perdue (Brawley et Matunis 2004). Chez les mammifères, la niche hématopoïétique présente les exemples de dynamisme, en réponse à des stimuli multiples les plus frappants. Il a été montré que cette niche était capable de résister à une irradiation létale en attirant des CSH fraîchement transplantées pour reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique et de se régénérer elle-même par des interactions complexes entre ses cellules stromales et résidentes (Dominici *et al.* 2009). Le SDF-1 (*stromal-derived factor-1*) est un des facteurs cruciaux dans le processus de régénération de la niche par les CSH. Il permet le recrutement et la rétention des cellules souches transplantées et favorise la néovascularisation et la survie des cellules stromales et résidentes de la niche (Jin *et al.* 2006; Kortesisidis *et al.* 2005; Peled *et al.* 1999).

Une autre propriété de la niche hématopoïétique a récemment émergé en tant qu'actrice majeure dans les processus de vieillissement des cellules souches. Les cellules stromales de la niche hématopoïétique de souris âgées ont montré *in vitro* une réduction importante de leur capacité à soutenir la lymphopoïèse des cellules B par rapport aux cellules stromales de souris jeunes (Stephan *et al.* 1998). La transplantation de CSH de

donneurs jeunes dans des niches de receveurs plus âgés a influencé le destin de ces CSH en les poussant vers la lignée myéloïde (Liang *et al.* 2005) comme lors du vieillissement normal décrit chez la souris (Morrison *et al.* 1996). A l'inverse, la transplantation de CSH issues de souris âgées dans des niches de sujets jeunes a permis de restaurer en partie la production de sous-populations cellulaires B (Labrie *et al.* 2004). Le vieillissement de la niche entraînant le vieillissement des CSA est un processus encore très mal connu qui répond à des facteurs locaux mais également systémiques. Des expériences de parabioses (deux animaux partagent la même circulation sanguine) ont montré que des facteurs sériques issus d'un environnement jeune pouvaient rétablir le nombre et le potentiel de prolifération de cellules satellites de souris âgées (Conboy *et al.* 2005).

La niche est un facteur qui participe activement au destin des cellules souches, soit en les maintenant en quiescence, soit en les poussant vers la prolifération. Néanmoins, quelque soit la situation envisagée, un stock constant de cellules souches est conservé au sein de la niche. Cet autorenouvellement des cellules souches est possible par un mode de division unique, la division asymétrique.

L'autorenouvellement des CSA

Le renouvellement du stock de CSA et leur entrée en différenciation repose sur deux modèles théoriques : la division asymétrique et la division symétrique (Figure 7). La division asymétrique est régulée par différents mécanismes qui sont en relation soit avec la cellule souche (facteurs intrinsèques) soit avec son microenvironnement ou niche (facteurs extrinsèques). Les facteurs intrinsèques vont réguler la polarité de la cellule avant sa division ou bien une répartition asymétrique des ARNm et/ou des protéines dans le cytoplasme avant la mitose. La niche favorise le maintien en quiescence du pool de cellules souches, notamment par l'orientation du fuseau mitotique. De cette façon, une des cellules filles reste au contact de la niche pour maintenir le stock de cellules indifférenciées alors que l'autre cellule fille, plus éloignée, va sortir de la niche pour entrer en différenciation (Morrison et Kimble 2006).

Lors de la division symétrique, le destin des deux cellules filles est identique. La mitose de la cellule mère donne naissance soit à deux cellules souches soit à deux progéniteurs qui vont s'engager dans une voie de différenciation.

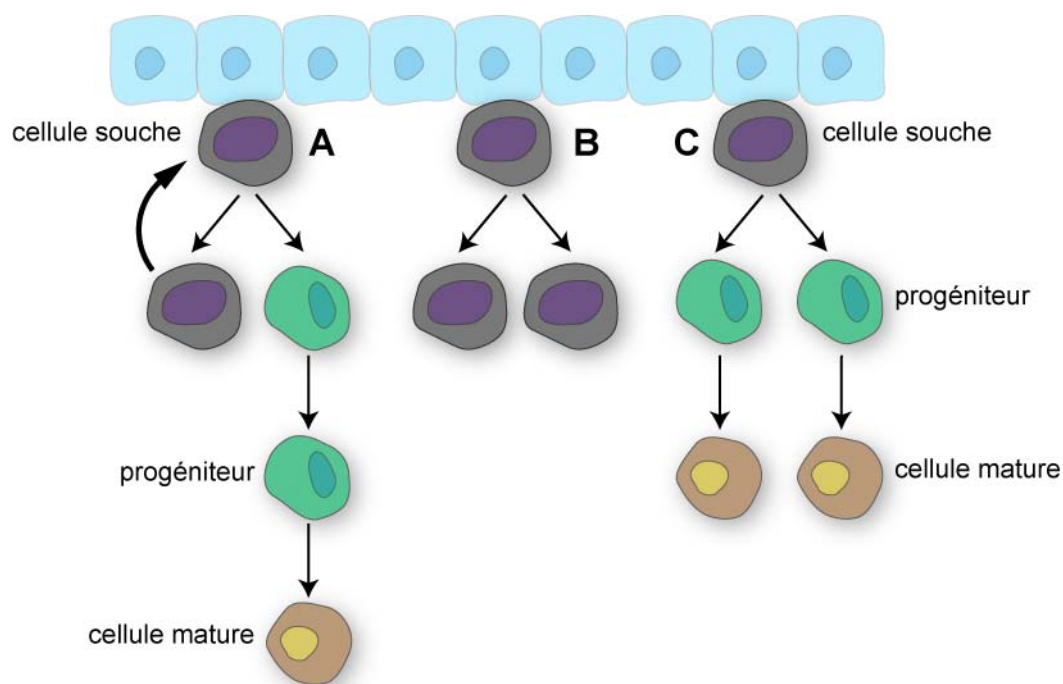


Figure 7. Théorie des divisions symétriques et asymétriques. (A) Division asymétrique. (B et C) Divisions symétriques. Adapté de (Morrison et Kimble 2006).

Ces deux mécanismes ont d'abord été mis en évidence chez le ver *C.elegans* ou chez la drosophile avant d'être démontrés chez les mammifères, notamment au cours du développement du SNC (Shen *et al.* 2002) et de l'hématopoïèse (Morrison *et al.* 1995) chez les rongeurs. Ils semblent cohabiter non seulement au cours du développement mais également chez l'adulte. Le choix du mécanisme à adopter serait dicté par les besoins de l'organisme. La division asymétrique prédominerait en condition d'homéostasie alors qu'après une lésion ou lors d'un besoin d'expansion, la division symétrique prendrait l'ascendant (Morrison et Kimble 2006).

Il a également été suggéré une relation entre le mode de division des cellules souches et l'apparition de tumeurs. En effet, des perturbations dans la régulation de la division asymétrique chez la drosophile sont une source d'augmentation de la tumorigenèse (Causinus et Gonzalez 2005). D'autres évènements sont susceptibles de modifier le destin des cellules souches, notamment en ayant une influence sur leur durée de vie.

Mécanismes intrinsèques de régulation de la durée de vie des CSA

Le vieillissement cellulaire ou sénescence intervient lorsqu'une cellule subit un arrêt de la croissance, des changements phénotypiques irréversibles et des modifications radicales dans l'expression génique.

Parmi les facteurs favorisant l'apparition de la sénescence, le raccourcissement des télomères a été étudié dans les CSA. Pour étudier l'importance de la longueur des télomères dans les cellules souches de sujets adultes, des analyses ont été réalisées sur plusieurs générations de souris déficientes en télomérase, enzyme dont la fonction est de répliquer les télomères afin de conserver leur longueur (Allsopp *et al.* 1992; Counter *et al.* 1992). Il a été montré qu'à l'intérieur des compartiments des cellules souches de la peau des descendants des souris déficientes en télomérase, les télomères étaient plus courts que dans les souris sauvages (Flores *et al.* 2008). Dans une autre étude, les capacités de prolifération des CSH des souris déficientes en télomérase ont été réduites, ainsi que leur capacité à repeupler la MO de souris irradiées (Allsopp *et al.* 2003). Ces études montrent qu'une certaine stabilité des télomères est indispensable pour le maintien à long terme des capacités répliquatives des CSA.

Au même titre que les cellules somatiques, les CSA sont sujettes à de multiples facteurs pouvant altérer leur ADN (erreurs de réplication, radiations UV ou gamma, agents chimiques). Le même type de stratégie utilisé pour l'étude de la télomérase (inactivation de gènes) a été adopté pour analyser les effets des mutations de l'ADN sur les CSH. Des souris âgées déficientes en mécanismes de réparation de l'ADN ont montré une hématopoïèse quasi-normale en conditions d'homéostasie mais une capacité de réponse fortement diminuée en conditions de régénération tissulaire en comparaison avec des souris mutantes jeunes. De manière surprenante, les CSH quiescentes de ces souris âgées ont accumulé beaucoup plus de dommages de l'ADN que les progéniteurs en prolifération qui en dérivent (Rossi *et al.* 2007a). Ces travaux indiqueraient que les CSH accumulent des mutations même à l'état quiescent et que la réparation ou l'élimination des cellules par apoptose ne se fait que lorsqu'elles entrent en cycle (Rossi *et al.* 2007b; Zhou et Elledge 2000).

La première théorie mettant en relation le vieillissement cellulaire et l'action de radicaux libres oxygénés (RLO) a été suggérée par Harman en 1956 (Harman 1956). Depuis, les voies de réponse de la cellule au stress oxydatif ont été élucidées et montrées comme impliquées dans l'allongement de la durée de vie chez la drosophile (Orr et Sohal 1994) et chez le rongeur (Migliaccio *et al.* 1999). Les cibles cellulaires des RLO sont multiples (ADN, protéines, membranes) et les conséquences sont un arrêt de la croissance. Il a été montré que des souris déficientes en ATM (*ataxia telangiectasia-mutated*), une protéine impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN, accumulent de grandes quantités de RLO dans leur cytoplasme, entraînant une diminution fonctionnelle de leurs CSH. Cette perte de fonction a pu être rétablie par un traitement avec un agent antioxydant, prouvant que les RLO étaient bien responsables de l'effet sur les cellules souches (Ito *et*

al. 2004). Ces études, réalisées sur des CSH de souris, doivent maintenant être étendues à d'autres types de CSA et la transposition de ces résultats à l'homme reste également à démontrer.

1.4.3. Sources de confusion dans l'identification de populations de CSA

Les difficultés énoncées précédemment sur la caractérisation et la classification des populations de CSA ont favorisé l'émergence d'une certaine confusion concernant les propriétés des CSA.

Capacité d'autorenouvellement à long terme

Contrairement aux cellules ES, toutes les CSA ont un nombre limité de doublements *in vitro*. Il est très difficile de définir un nombre de passages minimum pour qualifier une population cellulaire souche. En outre, un progéniteur étant également capable d'autorenouvellement, il est important de parvenir à distinguer les deux populations (Seaberg et van der Kooy 2002).

Capacité de différenciation

In vitro, des cellules qui expriment quelques protéines et transcrits spécifiques d'un tissu n'ont pas forcément les mêmes propriétés que leurs homologues *in vivo* (Geraerts et Verfaillie 2009) d'où l'importance d'études fonctionnelles au moins *in vitro* et si possible *in vivo*.

Capacité de régénération tissulaire

Ce critère, même associé aux deux précédents ne garantit pas toujours d'être en présence d'une population de CSA (Seaberg et van der Kooy 2002). De plus, la maintenance à long terme *in vivo* et la reconstitution d'un tissu à l'intérieur d'un organisme ne sont pas une chose aisée à analyser puisqu'il faut être en mesure de suivre et de discriminer les cellules introduites.

L'illustration la plus probante de la confusion qui règne dans le domaine des CSA est représentée par les CSM. Depuis le début des années 2000, plusieurs groupes ont isolé des populations cellulaires de CSM de la MO qui possèderaient des propriétés se rapprochant des cellules pluripotentes. Les MAPC (*multipotent adult progenitor cells*) ont été isolées d'abord à partir de MO d'origine humaine {Reyes, 2001 #294} et murine (Jiang *et al.* 2002a) puis à partir d'autres tissus de rongeurs (Jiang *et al.* 2002b) et de différents organismes

(Zeng *et al.* 2006). Ces cellules se sont différenciées *in vitro* en cellules fonctionnelles des trois feuillets embryonnaires et ont démontré une fonctionnalité *in vivo* en reconstituant la MO de souris NOD/SCID irradiées (Jiang *et al.* 2002a; Serafini *et al.* 2007). Cependant, la validité de certaines expériences a été remise en cause car non reproduites par d'autres équipes. Concernant notamment la différenciation en cellules neurales, les changements morphologiques observés dans les cellules MAPC-*like* ont été attribués à la suppression de sérum dans les cultures alors que certains marqueurs neuronaux exprimés dans les cellules différenciées étaient déjà présents à des niveaux comparables dans les cellules avant différenciation (Raedt *et al.* 2007). D'autres populations de CSM ont également été décrites comme capables de se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. On peut citer par exemple les cellules MIAMI (*marrow-isolated adult multilineage inducible*), isolées à partir de la MO (D'Ippolito *et al.* 2004), les hBMSC (*human bone marrow-derived multipotent stem cells*), issues également de la MO (Yoon *et al.* 2005b) ou les MASC (*multipotent adult stem cells*), isolées à partir de différents tissus (foie, cœur et MO) (Beltrami *et al.* 2007). Pour ces populations, certains critères comme des tests de fonctionnalité *in vitro* ou *in vivo* après différenciation n'ont pas été communiqués.

Il ne s'agit que de quelques exemples, néanmoins représentatifs de l'absence de consensus observée dans la littérature entraînant certaines confusions dans l'utilisation du terme cellules souches. Malgré ces confusions de définitions, les travaux actuels ne remettent pas en cause le potentiel des CSA et leurs applications encourageantes en médecine régénérative.

Expression et fonction des gènes de pluripotence dans les CSA

OCT4 est un des facteurs de transcription clés de la pluripotence des cellules ES. L'existence de pseudogènes et d'isoformes d'OCT4 a conduit à une controverse importante quant à son expression et sa fonction dans les CSA. A l'instar de la télomérase, l'expression d'OCT4 a été recherchée dans les CSA comme marqueur d'immaturité cellulaire. Nous nous limiterons à l'exemple d'OCT4 qui dispose d'une littérature abondante. Néanmoins, un raisonnement similaire peut être adopté pour un autre gène jouant également un rôle clé dans le maintien de la pluripotence, NANOG.

Les pseudogènes sont des séquences génomiques qui présentent des homologies plus ou moins importantes avec un gène connu ou gène parental et sont considérés comme non fonctionnels soit parce qu'ils ne sont pas transcrits soit parce qu'ils ne sont pas traduits. Il existe deux types de pseudogènes :

(i) Les pseudogènes *processed* ou rétro-pseudogènes, issus de la retrotransposition d'un ARNm dans le génome et reconnaissables par l'absence d'intron et de promoteur en 5' (Pavlicek *et al.* 2002).

(ii) Les pseudogènes *nonprocessed*, duplications de la séquence du gène connu ayant subi par la suite des mutations induisant une perte de fonction (Mighell *et al.* 2000).

Six pseudogènes ont été identifiés pour OCT4 (OCT4-pg1 à OCT4-pg6) (Pain *et al.* 2005) dans le génome humain.

Parmi les techniques de choix utilisées pour démontrer l'expression d'un gène, la RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) fait office de référence dans la communauté scientifique. Cependant, une digestion de l'ADN génomique incomplète et/ou un couple d'amorces peu judicieux peuvent entraîner l'amplification d'un pseudogène, même si celui-ci n'est pas transcrit. D'où la polémique concernant l'expression ou non d'OCT4 dans les CSH humaines issues de sang de cordon (Redshaw et Strain 2010).

Il existe deux isoformes décrites d'OCT4 (Takeda *et al.* 1992). OCT4A est le facteur de transcription, appelé jusqu'ici OCT4 dans ce manuscrit, impliqué dans la pluripotence des cellules ES. OCT4B ne semble pas avoir de fonction activatrice de la transcription et est localisé dans le cytoplasme (Lee *et al.* 2006a). L'homologie en C-terminal des deux isoformes peut provoquer des erreurs d'interprétation que ce soit par cytométrie en flux, par immunohistochimie (IHC) ou par *Western Blot* comme cela a été suggéré par différentes études (Kotoula *et al.* 2008; Liedtke *et al.* 2008). Il en va de même lors d'expériences de RT-PCR menées avec des amorces nucléotidiques choisies dans la région 3' qui correspond à la région homologue des deux variants (Liedtke *et al.* 2008).

Outre son importance dans le maintien de la pluripotence des cellules de la MCI et des cellules ES, OCT4 a été décrit comme persistant et indispensable pour la viabilité des cellules souches germinales (Kehler *et al.* 2004) et comme exprimé dans les tumeurs testiculaires humaines ayant pour origine des cellules souches germinales (Gidekel *et al.* 2003). Le caractère oncogénique d'OCT4 a été encore plus appuyé lors de la production ectopique de cette protéine dans des tissus somatiques, en favorisant l'expansion de cellules progénitrices et la formation de tumeurs invasives dans l'intestin et la peau (Hochedlinger *et al.* 2005). Ces études sous-tendent un rôle d'OCT4 dans le maintien de la pluripotence, aux stades embryonnaire et germinale, mais pas chez l'adulte.

Afin de confirmer ces résultats, Lengner *et al.* ont délété le gène OCT4 dans plusieurs tissus contenant des CSA et ont analysé l'homéostasie tissulaire et la régénération post lésionnelle qui en ont découlé. Ces auteurs ont prouvé que la délétion d'OCT4 ne révèle

aucune modification dans l'homéostasie ou la régénération de l'intestin, de la MO, du follicule pileux, du foie et du système nerveux. De plus, par une construction OCT4-eGFP (OCT4-*enhanced Green Fluorescent Protein*), la répression du locus OCT4 a été confirmée chez l'adulte (Lengner *et al.* 2007).

A l'heure actuelle, il semble que même si OCT4 est exprimé dans certains types de CSA, son niveau d'expression est sans doute trop faible pour avoir un réel rôle.

1.5. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

1.5.1. Découverte et origine

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été découvertes dès les années soixante par Friedenstein *et al.* qui ont isolé des cellules issues de la MO, différentes des CSH car adhérentes à la surface de culture, ayant un potentiel de différenciation ostéogénique à la fois en culture et *in vivo*. Ces cellules fusiformes, capables de former des colonies clonales en culture, ont d'abord été nommées CFUs-F (*colony forming units-fibroblastic*) puis *marrow stromal cells* devant leur capacité à soutenir à long terme l'hématopoïèse *in vitro* (Friedenstein *et al.* 1974a; Friedenstein *et al.* 1974b; Friedenstein *et al.* 1968; Friedenstein *et al.* 1966; Mori *et al.* 1978). Ce n'est que plus tard que le caractère souche de ces cellules a été mis en évidence et que le terme *bone marrow stromal stem cells* a été proposé (Owen et Friedenstein 1988). La culture en conditions spécifiques a montré qu'une fraction seulement des cellules issues de la MO avait un fort potentiel d'autorenouvellement soulignant l'hétérogénéité des populations isolées constituées en réalité d'un mélange de cellules souches et de progéniteurs plus ou moins immatures. Ces cellules dotées d'autorenouvellement ont pu par la suite être différenciées en fibroblastes, adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes.

Le terme cellules souches mésenchymateuses n'est apparu qu'un peu plus tard, lorsque les travaux sur la différenciation de ces cellules ont été plus poussés (Caplan 1991). Par la suite, de nombreuses équipes ont validé ces résultats et ont isolé des cellules ayant des caractéristiques similaires aux CSM de la MO à partir d'autres organes ou tissus tel que le tissu adipeux (Zuk *et al.* 2001), le sang de cordon (Bieback *et al.* 2004), le tendon (Salingcarnboriboon *et al.* 2003), le ligament parodontal (Seo *et al.* 2004), le muscle (Lee *et al.* 2000), la peau (Toma *et al.* 2001) ou le poumon (Kajstura *et al.* 2011). Cependant il a été montré une variation dans l'expression d'un nombre significatif de gènes dans différentes lignées de CSM (Wagner *et al.* 2005) pouvant expliquer des

différences observées en terme de potentiel de différenciation et de fonction (Kern *et al.* 2006).

Ces résultats sur la présence de CSM à travers tout l'organisme soulève des interrogations quant à leur origine toujours inconnue. Deux hypothèses sont à l'étude. Soit les CSM sont localisées au sein d'une niche spécifique dans chaque organe, soit elles sont en étroite relation avec une structure commune à tous les organes, le réseau vasculaire. Confortant cette dernière hypothèse, plusieurs études suggèrent la cellule souche périvasculaire ou péricyte comme la CSM commune à tous les organes. En effet, une fois libérée de sa niche périvasculaire, cette cellule est capable de se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes (Brighton *et al.* 1992; da Silva Meirelles *et al.* 2008; Farrington-Rock *et al.* 2004; Shi et Gronthos 2003). Les deux origines potentielles des CSM mobilisées lors de lésions restent actuellement peu claires et fortement débattues (Feng *et al.* 2011).

1.5.2. Définition des CSM selon l'ISCT

Du fait qu'elles sont présentes dans de multiples tissus et de l'absence de marqueurs spécifiques pour les caractériser, les CSM représentent sûrement le meilleur exemple de la confusion qui règne dans la définition d'une cellule souche comme évoqué précédemment dans l'introduction sur les CSA. C'est pourquoi en 2006, l'ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) a statué sur une définition concernant les CSM (Dominici *et al.* 2006) qui stipule que :

"Toute population cellulaire obtenue à partir d'un tissu ou organe ayant les caractéristiques minimums suivantes :

(i) adhérence au plastique en conditions de culture standard (par opposition aux cellules hématopoïétiques),

(ii) combinatoire d'expression des marqueurs de surface CD105, CD73 et CD90 et d'absence d'expression de CD45, CD34, CD14 ou CD11b.

(iii) capacité à se différencier *in vitro* dans les types cellulaires du lignage mésenchymateux (adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes),

pourra être dénommée Multipotent Mesenchymal Stromal cells", ou CSM.

1.5.3. Usage des CSM en thérapie cellulaire

Le rôle des CSM en tant que support stromal des CSH dans la niche hématopoïétique de la MO (Sacchetti *et al.* 2007; Whetton et Dexter 1993) a été le premier paradigme des CSM et a permis d'explorer de nouvelles pistes pour l'amélioration des greffes de moelle.

Le deuxième champ d'investigation est issu des capacités de différenciation des CSM en chondrocytes et ostéoblastes et de leur faculté à s'intégrer dans le tissu osseux ou cartilagineux après une greffe (Owen et Friedenstien 1988). Ces aptitudes appuyées par des observations montrant une amélioration de la réparation osseuse après administration locale de CSM (Bruder *et al.* 1994) ont ouvert la voie à de nombreuses études sur l'utilisation des CSM en administration locale ou systémique dans différents modèles de lésions ou de maladies induisant une perte cellulaire. Malgré des améliorations de fonction notables dans certains modèles (Chopp *et al.* 2009; Krause *et al.* 2007; Lee *et al.* 2006b), peu de données ont pu être rassemblées sur l'intégration des CSM dans certains tissus comme le muscle squelettique ou cardiaque et sur leur différenciation en cellules hôtes.

Ces résultats ont poussé les chercheurs à réexaminer de plus près les propriétés des CSM *in vivo* et à mettre le doigt sur un autre aspect de ces cellules : leur capacité à répondre aux signaux provenant des tissus lésés par la sécrétion de molécules aux effets paracrines multiples et par un contact cellule-cellule. Ces facteurs solubles et ce contact cellulaire confèrent aux CSM la capacité, par exemple, de réguler la réponse du système immunitaire (Uccelli *et al.* 2008). Ces propriétés immunorégulatrices favorisent une modulation de l'inflammation après un infarctus entraînant une réduction de la cicatrice fibreuse cardiaque (Iso *et al.* 2007) ou permettent de protéger les cellules somatiques de l'apoptose sur le site lésionnel (Block *et al.* 2009).

Bien que nos connaissances sur les CSM soient de plus en plus grandes, il reste à déterminer quels sont les mécanismes (contact cellulaire, fusion, transdifférenciation ou effet paracrine) qui permettent aux CSM de répondre spécifiquement à une lésion tissulaire et d'induire une réponse régénérative. Outre l'aspect fondamental, une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'optimiser le potentiel de régénération des dites cellules.

1.6. Les CSM du tissu adipeux

1.6.1. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux constitue un réservoir de choix pour l'étude des cellules souches adultes que ce soit à visées pharmacologique, thérapeutique ou de recherche fondamentale. Ce tissu est facilement accessible, souvent présent en grande quantité, le nombre de cellules récoltées est généralement élevé et les risques pour le patient lors du prélèvement sont minimes.

Le tissu adipeux dérive du feuillet mésodermique de l'embryon et se développe avant et après la naissance (Martin *et al.* 1998; Nnodim 1987). Après la naissance, il existe deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux blanc (TAB) et le tissu adipeux brun (TABr) (Cinti 2005). L'origine endothéliale, péricytaire ou stromale des cellules préadipocytaires (ou progéniteurs adipogéniques) à l'origine des adipocytes matures reste à élucider (Wright et Hausman 1990a; Wright et Hausman 1990b).

Le TAB est constitué d'adipocytes, cellules différenciées gorgées de lipides qui représentent 40 à 60% des types cellulaires du tissu adipeux. Les adipocytes sont groupés en lobules eux-mêmes séparés par des cloisons conjonctives ou fraction stroma-vasculaire, comprenant des fibres de collagène, des capillaires sanguins, des mastocystes, des préadipocytes et des fibroblastes. C'est dans cette fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux que sont localisées les CSM (Zuk *et al.* 2002).

1.6.2. Les cellules souches du TAB

Découverte et caractéristiques

C'est l'étude de certaines pathologies humaines qui a permis de soupçonner l'existence de cellules souches au sein du TAB (Gimble *et al.* 2007). L'hétérotopie osseuse progressive est une maladie rare au cours de laquelle une formation ectopique de tissu osseux se produit dans le tissu adipeux sous-cutané. L'analyse histologique de cette formation ectopique a montré la présence d'ostéoblastes et de chondrocytes dans ces lésions en plus des adipocytes (Kaplan *et al.* 1994) supportant le concept de la présence de progéniteurs multipotents dans ce tissu. Le tissu adipeux est sujet au développement de tumeurs appelées lipomes et liposarcomes qui atteignent les dépôts adipeux sous-cutanés ou viscéraux. Les liposarcomes ont montré l'expression du récepteur hormonal nucléaire clé de l'adipogénèse, PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*). Un traitement

avec un ligand de ce récepteur a permis de réduire la prolifération cellulaire tumorale et de favoriser la différenciation adipocytaire (Demetri *et al.* 1999; Tontonoz *et al.* 1997), suggérant l'hypothèse que ces tumeurs dérivent d'une cellule souche. Enfin dans le cadre de l'obésité, il a été démontré un taux de renouvellement de six à quinze mois des adipocytes chez l'humain (Strawford *et al.* 2004). Ces travaux associés à d'autres résultats suggèrent que le volume de tissu adipeux est régulé et maintenu constant et qu'en cas de perte de poids rapide, ce mécanisme serait mis en jeu pour retrouver le volume initial (Cone 1999), notamment par la génération de nouveaux adipocytes issus des cellules souches.

C'est en 2001 que l'existence de cellules souches dans le tissu adipeux a été rapporté pour la première fois (Zuk *et al.* 2001). De nombreuses terminologies ont depuis été utilisées pour désigner les populations de cellules souches dérivées de ce tissu. Les plus communes sont : cellules PLA (*Processed lipoaspirate cells*) (Zuk *et al.* 2001) et cellules (stromales) souches dérivées du tissu adipeux (ADSC ou *Adipose-Derived Stromal/Stem Cells*) (Schaffler et Buchler 2007). Ces populations cellulaires sont généralement extraites après digestion enzymatique de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux provenant de liposuccions d'individus adultes. Cette fraction est très hétérogène et contient un mélange de cellules endothéliales, de fibroblastes, de cellules vasculaires, de macrophages et de précurseurs et progéniteurs adipocytaires. Les précurseurs et progéniteurs perdent rapidement leurs propriétés de plasticité et ont une durée de vie limitée due à l'absence d'une activité télomérase. Il est donc préférable de les utiliser soit avant leur mise en culture si la quantité isolée est suffisante, soit après un nombre limité de passages (2 à 3 passages maximum). Ces cellules ont montré des capacités de différenciation dans les trois lignages embryonnaires : mésodermique (Awad *et al.* 2003; Lee *et al.* 2008; Mauney *et al.* 2007; Planat-Benard *et al.* 2004a; Planat-Benard *et al.* 2004b; Zuk *et al.* 2001), endodermique (Banas *et al.* 2007; Seo *et al.* 2005) et ectodermique (Safford *et al.* 2002; Zuk *et al.* 2002).

Utilisation des ADSC en pharmacologie et thérapie

En dépit des inconvénients cités ci-dessus (hétérogénéité et durée de vie limitée), le potentiel de différenciation remarquable de ces cellules les rend très attractives en tant qu'outil pharmacologique ou pour une utilisation thérapeutique, notamment en ingénierie tissulaire. En pharmacologie, les cellules matures dérivées des ADSC peuvent être utilisées comme lignée cellulaire de référence dans les tests des nouvelles molécules à visée thérapeutique ou cosmétique. Quant aux cellules plus immatures, leurs propriétés sécrétrices (Kilroy *et al.* 2007) en font de bonnes candidates pour les nouvelles approches

combinant thérapie cellulaire et thérapie génique pour une expression stable et continue d'un gène impliqué dans la guérison ou dans l'élimination de cellules cancéreuses (Grisendi *et al.* 2010; Liu *et al.* 2010).

Dans le cadre de la régénération tissulaire, les ADSC ont été montrées comme capables d'adhérer à des supports biomimétiques, de migrer, de proliférer et de se différencier pour restaurer la fonction du tissu osseux *in vivo* (Cowan *et al.* 2004; Jeon *et al.* 2008; Li *et al.* 2010; Lin *et al.* 2007). Les ADSC ont également démontré des propriétés immuno-modulatrices dans certaines maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde (Gonzalez-Rey *et al.* 2010) et leur utilisation dans des maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse est actuellement en cours d'investigation (Garcia-Olmo *et al.* 2008; Gonzalez-Rey *et al.* 2009). Enfin les ADSC ont été rapportées comme améliorant la prise de greffe en prévenant la maladie du greffon contre l'hôte en transplantation allogénique de moelle osseuse (Puissant *et al.* 2005; Yanez *et al.* 2006).

L'immuno-privilège et l'immuno-modulation des ADSC sont dus à l'absence d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Aust *et al.* 2004; Gronthos *et al.* 2001) et à leur capacité à inhiber la prolifération des lymphocytes activés (Cui *et al.* 2007; McIntosh *et al.* 2006; Niemeyer *et al.* 2008; Puissant *et al.* 2005). Cette suppression de prolifération des lymphocytes est complétée par une inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des lymphocytes T CD4 et CD8, par une stimulation de la production de la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 et par l'induction de la génération de lymphocytes T régulateurs (Gonzalez-Rey *et al.* 2010).

Plus de 20 essais cliniques, dont certains en phase IV, sont actuellement menés avec des ADSC, que ce soit en thérapie cellulaire (reconstruction mammaire, diabète de type 1, arthrite) ou pour leurs propriétés immuno-modulatrices (maladie du greffon contre l'hôte) (www.clinicaltrials.gov).

1.6.3. Les cellules hMADS

Obtention et caractéristiques

Les cellules souches hMADS représentent un autre type de cellules souches plus immatures que celles décrites précédemment. Ces cellules ont été établies à partir d'exérèses chirurgicales de TAB de jeunes enfants âgés de moins de 8 ans (Rodriguez *et al.* 2004) pour diminuer les risques potentiels d'une perte de fonctionnalité associée à un effet

néfaste du vieillissement cellulaire antérieurement rapporté (Edelberg *et al.* 2002; Geiger et Van Zant 2002).

Les cellules hMADS sont obtenues par une méthode d'enrichissement dans laquelle le tissu adipeux a été digéré par un traitement à la collagénase qui va libérer la fraction stroma-vasculaire (FSV) contenant en théorie les cellules souches mais également des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des péricytes et des fibroblastes. L'autre fraction est constituée de cellules flottantes, en majorité des adipocytes qui seront rapidement éliminés. Deux populations cellulaires ont pu être isolées à partir de la FSV en fonction de leur vitesse d'adhésion au plastique, des cellules dont le temps d'adhésion est inférieur à 12 heures (CA) ou supérieur à 12 heures (CS) (Rodriguez *et al.* 2005b). Ces deux populations sont capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes. Néanmoins, après 60 à 80 doublings de population, les cellules CS cessent de proliférer, perdent leur plasticité cellulaire et montrent des signes de sénescence, suggérant que cette population était essentiellement constituée de cellules progénitrices. A l'inverse, à ce stade de la culture, les cellules CA entrent en quiescence, caractéristique propre aux CSA *in vivo* dans leur niche, mais ont la capacité de proliférer en présence du facteur mitogène humain FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) et conservent leur plasticité cellulaire. Ces résultats évoquent une population CA essentiellement constituée de cellules multipotentes plus immatures.

Ces cellules, entrant spontanément en quiescence *in vitro*, ont été nommées cellules hMADS pour *human Multipotent Adipose-Derived Stem cells*. Leur phénotype est le suivant : CD44⁺, CD49b⁺, CD105⁺, CD90⁺, CD13⁺, Stro-1⁻, CD34⁻, CD15⁻, CD117⁻, Flk-1⁻, Gly-A⁻, CD133⁻, HLA-DR⁻ et HLA-I^{low}. Elles conservent un caryotype normal même après de nombreux doublings de population et leur phénotype en termes de marqueurs de surface est en accord avec la définition de l'ISCT. De manière intéressante, les cellules hMADS à des passages tardifs ont montré une expression faible du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et une absence d'expression du CMH de classe II suggérant une faible immunogénicité de celles-ci et semblent prometteuses pour une utilisation en allotransplantation. Enfin les cellules hMADS présentent une activité télomérase significative (20% de l'activité télomérase de la lignée référence HEK293T) en accord avec leur grande capacité d'autorenouvellement *in vitro* (supérieur à 200 doublings de population) (Rodriguez *et al.* 2005b).

Plasticité in vitro

Concernant leur plasticité *in vitro*, les cellules hMADS se différencient avec une très haute efficacité et spécificité en adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes et myoblastes squelettiques après exposition à des milieux conditionnés (Figure 8). L'adipogenèse a été vérifiée par expression des ARNm de PPAR γ 2 et de l'aFABP (*adipocyte fatty acid binding protein*) et par coloration à l'Oil Red-O des triglycérides intracellulaires. La lipolyse en réponse aux agonistes des récepteurs β 1- et β 2-adrénergiques et la faculté des adipocytes à sécréter de la leptine et de l'adiponectine ont également été mises en évidence et montrent que les adipocytes dérivés des cellules hMADS sont fonctionnels. La différenciation ostéoblastique a été validée par la coloration au rouge Alizarine qui reflète la calcification de la matrice extracellulaire et par la détection de l'ARNm de l'ostéocalcine, un marqueur de différenciation terminale de l'ostéogenèse. Enfin la coloration au bleu Alcian a permis de déterminer la présence de glycosaminoglycanes sulfatés caractéristiques de la matrice extracellulaire chondrogénique. Les cellules hMADS exposées aux conditions de différenciation myogénique ont exprimé les ARNm de la desmine et de MyoD1 et un immunomarquage a permis de mettre en évidence la myogénine, un facteur de transcription de la voie myogénique. Cependant aucune formation de myotubes n'a été observée suggérant que bien que pouvant entrer dans le lignage myogénique, les cellules hMADS sont incapables d'achever le processus de différenciation en formant des myotubes (Rodriguez *et al.* 2005b).

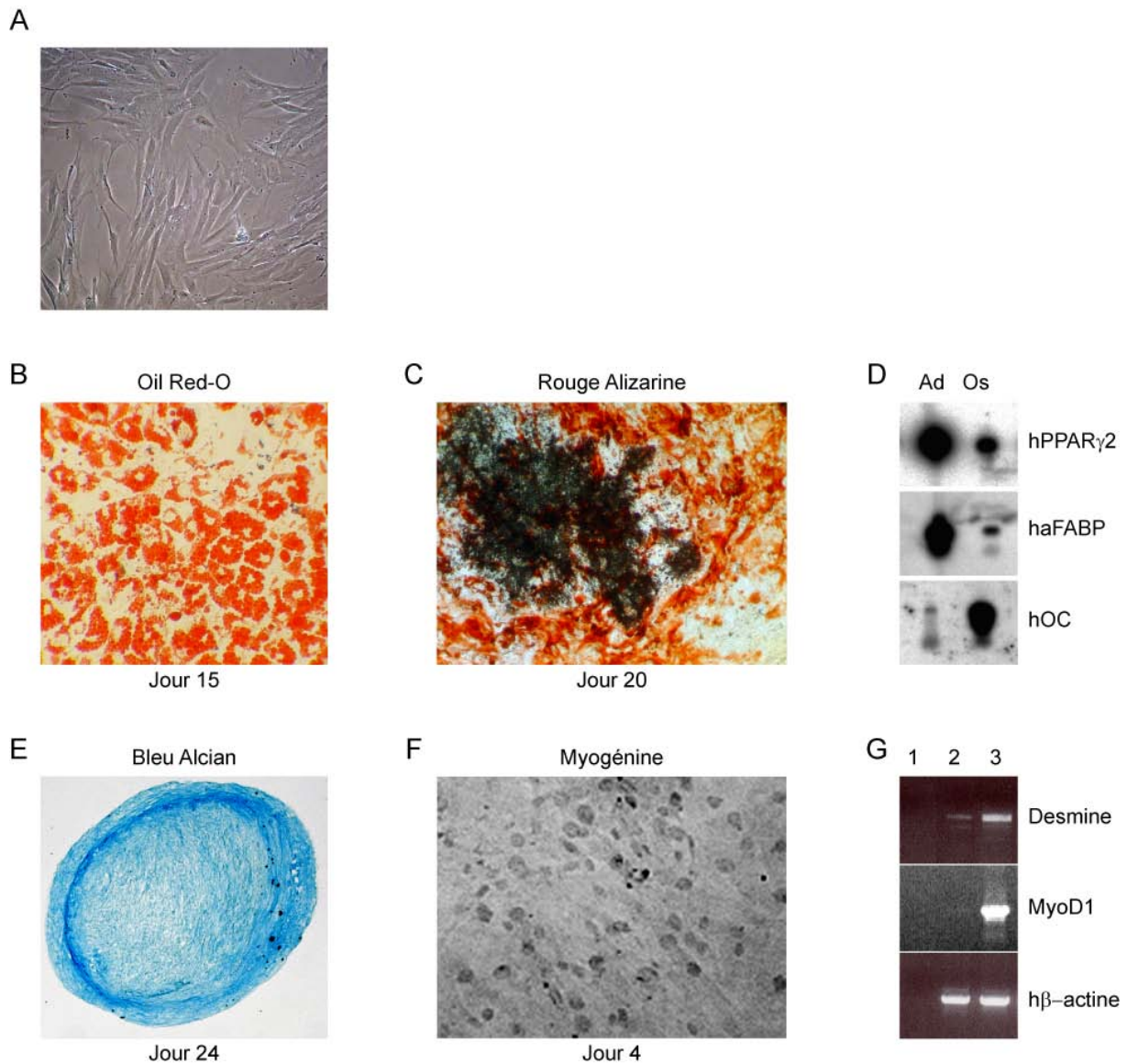


Figure 8. Plasticité des cellules hMADS *in vitro*. (A) Cellules hMADS indifférenciées en culture. (B) Marquage des gouttelettes lipidiques à l'Oil Red-O après différenciation des cellules hMADS dans un milieu adipogénique. (C) Coloration de la calcification de la matrice extracellulaire au rouge Alizarine après différenciation des cellules hMADS dans un milieu ostéogénique. (D) Analyse en RT-PCR de l'expression de hPPAR γ 2, de haFABP (deux gènes spécifiques des adipocytes) et de hOC (ostéocalcine, spécifique des ostéoblastes) dans des cellules hMADS différenciées en adipocytes (Ad) et ostéoblastes (Os). (E) Coloration de la matrice extracellulaire chondrogénique au bleu Alcian après différenciation des cellules hMADS dans un milieu chondrogénique. (F) Marquage à la myogénine après différenciation des cellules hMADS dans un milieu myogénique. (G) Analyse en RT-PCR de l'expression de la Desmine et de MyoD1 (gènes spécifiques de cellules musculaires) dans des cellules hMADS indifférenciées (piste 2) ou dans un milieu myogénique (piste 3). Piste 1 : contrôle négatif. Adapté de (Rodriguez *et al.* 2005b).

Plasticité in vivo

Les capacités d'autorenouvellement et de différenciation ont été vérifiées et confirmées à l'échelle clonale. Des expériences *in vivo* ont permis de mettre en évidence les propriétés régénératives des cellules hMADS (Rodriguez *et al.* 2005b). Les cellules ont été injectées dans des muscles squelettiques de souris mdx déficientes en dystrophine (protéine sous-membranaire essentielle à la stabilité de la structure de la fibre musculaire) et modèle de la myopathie de Duchenne. Dix jours après injection dans les *tibialis anterior* de souris immunocompétentes, des myofibres positives pour l'expression de dystrophine ont été retrouvées sous formes de clusters avec localement plus de 50% de fibres exprimant la dystrophine humaine (Figure 9A). Ce pourcentage augmente pour atteindre 90% de fibres positives pour la dystrophine humaine dans la zone injectée six mois après l'injection (Figure 9A). A l'aide d'une sonde centromérique spécifique des noyaux humains, les cellules hMADS ont été retrouvées dans les fibres musculaires murines, témoignant d'une fusion cellulaire ou cytogamie. Néanmoins, le mécanisme à l'origine de la régénération n'est pas un phénomène de transdifférenciation. En effet, à l'exception de la dystrophine humaine, l'expression d'autres marqueurs myogéniques humains n'a pas pu être détectée par RT-PCR réalisée à partir d'ARN de muscle transplanté. Une seconde analyse cytogénétique en double FISH, avec des sondes dirigées contre l'ADN humain et murin, a permis de mettre en évidence que ces noyaux contenaient à la fois du matériel génétique d'origine humaine et murine, révélant un mécanisme de fusion nucléaire ou karyogamie donnant naissance à des synkaryons (Figure 9B). Parallèlement à ces événements de karyogamie et à la persistance de l'expression de dystrophine humaine, il a pu être établi par RT-PCR qu'un grand nombre de marqueurs humains comme la β -actine devenaient rapidement indétectables (Figure 9C). Ces résultats suggèrent que dans ce contexte de karyogamie et de formation de synkaryons, on assiste à l'élimination progressive des chromosomes humains au cours des divisions successives à l'exception des chromosomes apportant une complémentation conférant un avantage sélectif à la cellule (Nora *et al.* 1994).

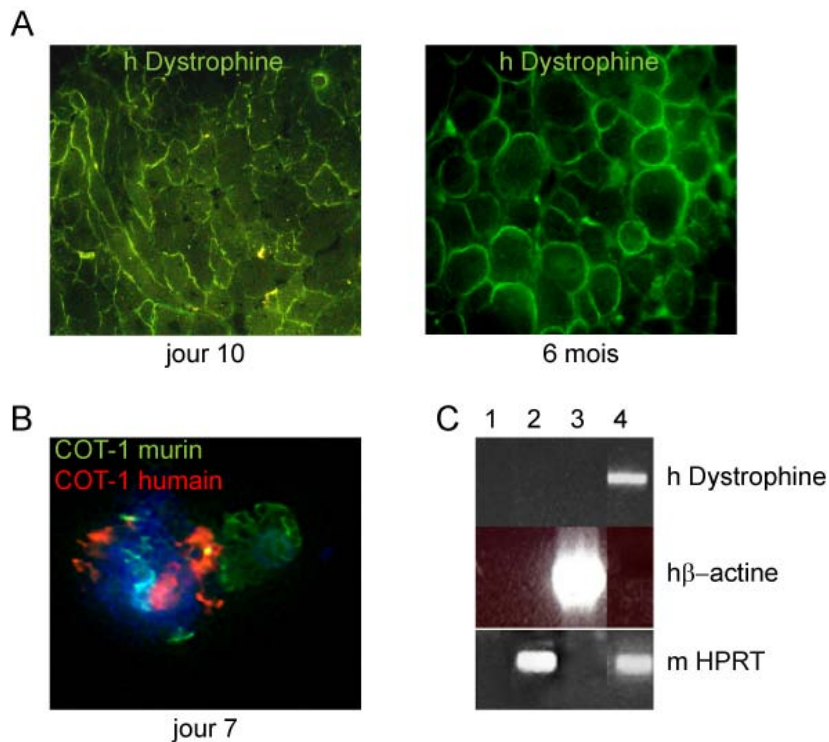


Figure 9. Potentiel de régénération des cellules hMADS dans le muscle squelettique de souris mdx. (A) Expression de la forme humaine de la dystrophine 10 jours et 6 mois après l'injection de cellules hMADS dans le *tibialis anterior* de souris mdx immunocompétentes. (B) Noyau hybride contenant de l'ADN murin (FITC, vert) et humain (Cy3, rouge) témoignant d'un mécanisme de fusion nucléaire entre les cellules hMADS et les cellules musculaires de la souris mdx. (C) Analyse en RT-PCR de l'expression de gènes humains et murins spécifiques du muscle (dystrophine humaine) ou ubiquitaires (β -actine humaine et HPRT murine) dans le *tibialis anterior* non injecté (piste 2), dans les cellules hMADS seules (piste 3) et dans le *tibialis anterior* 6 mois après injection de cellules hMADS (piste 4). Piste 1 : contrôle négatif. HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase. D'après (Rodriguez *et al.* 2005a).

L'étude des cellules hMADS a permis de mettre en évidence le mécanisme de fusion (i) dans le cadre de la régénération du muscle squelettique. Cependant, d'après la littérature, ce n'est pas le seul mécanisme intervenant dans la régénération tissulaire médiée par les cellules souches. Les autres modalités de régénération sont :

(ii) la transdifférenciation, permettant aux cellules souches de s'orienter dans une voie de différenciation différente de celles de leur tissu d'origine (même si ce n'est pas le cas dans la correction du défaut génétique de la souris mdx décrite ci-dessus),

(iii) la sécrétion de molécules solubles ou de contact ayant des effets autocrines et paracrines (mécanisme que nous ne pouvons pas exclure dans ce modèle).

Tous ces mécanismes seront discutés dans la troisième partie de cette introduction.

2. L'infarctus du myocarde (IDM)

2.1. Conséquences fonctionnelles de l'IDM

L'ischémie myocardique responsable de l'infarctus fait référence à un déséquilibre entre les apports et les besoins en oxygène du myocarde faisant basculer l'organe d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. L'agression ischémique est responsable de nombreuses altérations (hémodynamiques, biochimiques et métaboliques) qui compromettent le fonctionnement normal du cœur.

Pendant les premières minutes d'ischémie, les dommages cellulaires restent totalement réversibles (Jennings et Reimer 1983). En revanche, si l'ischémie perdure, les cardiomyocytes seront endommagés irréversiblement et ce, même si l'ischémie est levée (reperfusion). La taille de la zone de nécrose qui correspond au territoire infarcté varie principalement en fonction de trois facteurs chez l'homme : la taille de la zone ischémique (zone à risque), la durée et l'intensité de l'ischémie (degré de réduction du débit sanguin myocardique) (Reimer *et al.* 1985).

Les conséquences fonctionnelles de l'ischémie-reperfusion sont des perturbations de l'activité électrique, de la contractilité, de la biochimie cellulaire, de l'ultrastructure, de la signalisation cellulaire, de l'expression génique et des voies de mort cellulaire. Au niveau cellulaire, les altérations liées à l'ischémie concernent des modifications du métabolisme énergétique (favorisation de la glycolyse anaérobie au détriment du métabolisme oxydatif), des perturbations ioniques (acidification intracellulaire par accumulation de lactate et de protons, augmentation des concentrations sodique et calcique intracellulaires et production d'espèces radicalaires), une activation enzymatique (endonucléases, phospholipases et calpaines) et le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

L'ensemble de ces événements peut aboutir à la mort des cellules cardiaques par plusieurs mécanismes : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. La répartition de ces voies au cours de l'IDM reste aujourd'hui difficilement quantifiable. Néanmoins, il est établi qu'il existe une hiérarchie au sein du territoire infarcté entre la nécrose et l'apoptose, directement liée à la concentration en oxygène. Il est possible de classer la zone ischémisée en plusieurs régions. Une zone centrale, appelée cœur de l'infarctus, caractérisée par une anoxie où le phénomène prédominant est de type nécrotique et une zone bordante, en hypoxie, riche en cardiomyocytes majoritairement apoptotiques (Mani 2008).

2.2. Prise en charge des patients atteints d'IDM

La prise en charge de l'IDM a beaucoup évolué au cours des cinquante dernières années. Perez-Gonzalez *et al.* ont pu mettre en évidence un lien entre la taille de la zone infarctée et la mortalité à court, moyen et long terme pour les patients (Perez-Gonzalez *et al.* 1982). Les stratégies mises en place visent donc à réduire au maximum la période ischémique. Les traitements actuels de l'infarctus aigu peuvent être répertoriés en quatre catégories (Bassand *et al.* 2007) :

(i) Les agents pharmacologiques anti-ischémiques

Ces molécules permettent la diminution de la consommation en oxygène du cœur et/ou l'induction d'une vasodilatation. Les bêtabloquants, les dérivés nitrés et les inhibiteurs de canaux calciques font partie de cette famille.

(ii) Les agents pharmacologiques anticoagulants

Les anticoagulants sont utilisés pour inhiber la synthèse et l'action de la thrombine et vont ainsi réduire les événements de thrombus et favoriser la fluidification du sang.

(iii) Les agents pharmacologiques antiagrégants plaquettaires

Cette classe de molécules comprenant l'aspirine sert de traitement non seulement pendant la phase aiguë mais également pendant la phase chronique chez les patients présentant une inflammation des parois artérielles, diminuant ainsi le risque d'événements athérotrombotiques.

(iv) La revascularisation coronaire

Avant toute intervention de revascularisation, qu'elle soit percutanée ou chirurgicale, la coronarographie (examen radiologique qui permet de visualiser les artères coronaires et de détecter un rétrécissement ou une obstruction) est une étape indispensable qui va permettre de déterminer quel traitement adopter par la suite. L'angioplastie ou intervention coronarienne percutanée, consiste à gonfler un ballonnet dans la coronaire obstruée. Dans la très grande majorité des cas, l'angioplastie au ballonnet est complétée par la mise en place d'un stent, petite prothèse métallique en forme de ressort qui est sertie sur le ballonnet et qui offre une résistance prolongée à la contrainte radiale exercée par la paroi de la coronaire.

Environ 10% des patients ayant un syndrome coronaire aigu sans élévation du segment ST ne sont pas éligibles aux différents traitements cités ci-dessus et doivent subir un pontage aorto-coronarien. Cette chirurgie consiste à contourner une artère coronaire rétrécie ou obstruée en implantant un autre vaisseau en aval de cette dernière.

Tous ces traitements ne sont pas exclusifs et sont la plupart du temps proposés sous forme d'associations. De plus la durée des traitements pharmacologiques ne se limite pas à la phase aiguë et il est souvent nécessaire de poursuivre le traitement au long cours.

2.3. Remodelage myocardique post-infarctus

Une fois l'épisode ischémique terminé, un processus de réparation de la lésion va s'engager et la taille du territoire infarcté va influencer l'évolution de la maladie myocardique. Le terme de remodelage myocardique qualifie tous les états dans lesquels la structure normale du myocarde est modifiée (Swynghedauw 1999). C'est la perte de tissu contractile provoquée par l'apoptose et la nécrose survenant pendant les 2 jours après l'ischémie qui conditionne l'étendue du remodelage myocardique (Swynghedauw 1999).

Le déficit en cellules cardiaques provoque une surcharge mécanique sur le cœur résiduel qui, en réponse, va ralentir sa vitesse instantanée de contraction et réduire sa consommation en ATP. Cette dernière est le déclencheur d'un phénomène adaptatif qui représente un processus général au cours duquel un organe ou un organisme exprime un nouveau programme génétique en réponse à des changements environnementaux. Dans le cas présent, le seul programme génétique disponible est le programme foetal. L'expression de ce programme va provoquer certains changements phénotypiques permanents dont les plus importants sont une activation génique (induction de nouveaux gènes ou surexpression de gènes déjà exprimés) menant à une hypertrophie des cardiomyocytes et la non-induction de certains gènes, qui ne sont pas exprimés au cours de la vie foetale et qui vont faire diminuer l'efficacité du myocarde.

En plus du processus adaptatif, l'occlusion coronaire a également des effets sur la matrice extracellulaire cardiaque. L'augmentation de la concentration tissulaire en collagène, constituant majeur de la matrice extracellulaire cardiaque, est appelée fibrose. Dans le cœur, le collagène est synthétisé par les fibroblastes où il joue un rôle primordial dans le couplage des myocytes lors de la contraction et dans le maintien de l'ouverture des vaisseaux pendant la systole et le remplissage ventriculaire. Les lésions tissulaires consécutives à l'infarctus attirent des cellules de l'inflammation, surtout des macrophages qui produisent du TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*). Une des propriétés du TGF- β 1 est de transformer les fibroblastes intersticiels cardiaques en myofibroblastes capables notamment de synthétiser de l'angiotensine II (facteur pro-fibrosant) et les différents types de collagène participant à la fibrose.

Au cours du remodelage cardiaque, la fibrose altère la plupart des fonctions myocardiques. L'accumulation de collagène de type I et III augmente la rigidité du myocarde ce qui va avoir pour conséquences la diminution de l'efficacité de remplissage de la chambre ventriculaire et de l'éjection systolique et la génération d'arythmies par un manque d'homogénéité électrique (le collagène étant peu conducteur) (Delcayre et Swynghedauw 2002).

2.4. L'insuffisance cardiaque

La prise en charge d'un patient ayant survécu à un infarctus du myocarde vise plusieurs objectifs. Il faut avant tout prévenir une récurrence de l'infarctus et éviter le phénomène de mort subite. A plus long terme, l'accident ischémique peut donner naissance à une maladie chronique appelée insuffisance cardiaque qui est définie comme l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes en conditions normales. Prévenir ou traiter l'insuffisance cardiaque est également un objectif des thérapeutiques actuelles post-infarctus. Enfin, le dernier point s'attache à prévenir la survenue d'évènements cliniques dans d'autres territoires artériels.

Les outils thérapeutiques actuellement disponibles sont résumés dans le Tableau 2.

Buts du traitement	Outils
Prévention des récurrences	Bêtabloquants, antithrombotiques, statines, revascularisation, IEC, contrôle des facteurs de risque
Prévention de la mort subite	Idem + défibrillateurs si FE<30%
Prévention de l'insuffisance cardiaque	IEC ou ARA2 ± revascularisation
Traitement de l'insuffisance cardiaque	Idem + antialdostérones + diurétiques de l'anse ± revascularisation
Prévention des autres évènements artériels	Antithrombotiques + statines + contrôle des facteurs de risque + IEC

Tableau 2. Outils thérapeutiques post-infarctus. ARA2 : antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II ; FE : fraction d'éjection ; IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion. D'après (Monassier et Monassier 2007).

Brièvement, en plus des facteurs hygiéno-diététiques (régime hyposodé, arrêt de la consommation d'alcool et de tabac) et de la sensibilisation du patient (sur l'importance du

traitement et sur les facteurs hygiéno-diététiques), la prescription médicamenteuse tient une place prépondérante dans la prise en charge de l'insuffisance cardiaque. Les bêtabloquants contrecarrent le système adrénergique ce qui entraîne l'augmentation de la fraction d'éjection tout en réduisant les pressions de remplissage du ventricule gauche. Les statines jouent sur la stabilisation de la plaque d'athérome. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) bloquent la synthèse de l'angiotensine II. Les IEC sont des vasodilatateurs qui ont une action hémodynamique favorable sur la fonction pompe du cœur mais également diminuent le remodelage de part leur action antifibrosante. Enfin les diurétiques luttent contre la rétention hydrosodée ce qui diminue les risques d'œdèmes et facilite le travail contractile du cœur.

2.5. Enjeux de la thérapie cardiaque

La mortalité attribuée à une insuffisance cardiaque suite à un IDM s'explique notamment, avec les traitements standards, par l'absence de restauration de la fonction contractile liée à la perte cardiomyocytaire et à la raréfaction vasculaire. D'où la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pouvant induire une régénération efficace du muscle contractile et influencer sur les processus de remodelage et d'angiogenèse.

La médecine régénératrice est une discipline novatrice qui a pour but de réparer, remplacer et éventuellement régénérer un organe lésé. Cette médecine englobe des approches variées telles que l'implantation de biomatériaux, la thérapie génique ou la thérapie cellulaire. Cette dernière, fondée sur l'utilisation de cellules matures, précurseurs ou souches pour prévenir, traiter ou atténuer une maladie, fait l'objet de recherches intenses et fait naître de grands espoirs, notamment dans le domaine de la cardiologie.

Dans la troisième partie de cette introduction, je vais insister sur les différents types de cellules souches ayant un intérêt en thérapie cellulaire cardiaque, notamment les cellules souches adultes qui ne présentent pas d'inconvénients d'ordre éthique liés à leur production et dont le risque tumorigène est faible. Pour terminer j'exposerai les différents mécanismes mis en jeu par les CSA dans la régénération du myocarde.

3. Thérapie cellulaire cardiaque

3.1. Enjeux de la thérapie cellulaire cardiaque et choix de la cellule

Les stratégies actuelles de reperfusion et les progrès en pharmacologie cardiaque ont abouti à une augmentation de la proportion de patients qui survivent à un IDM. Cependant ces traitements demeurent symptomatiques et pas toujours efficaces. De plus, cette diminution des décès précoces entraîne une augmentation du nombre de patients souffrant d'insuffisance cardiaque avec toutes les conséquences négatives qui ont été détaillées dans la deuxième partie de l'introduction bibliographique. Face à la perte massive de cellules cardiaques (cardiomyocytes, cellules vasculaires et intersticielles) qui représente le problème central de l'IDM, la thérapie cellulaire offre le potentiel de contrecarrer cet écueil en réparant le myocarde lésé. Dans le cadre de la thérapie cellulaire cardiaque, les objectifs à atteindre sont les suivants :

- (i) remplacer le tissu cicatriciel fibreux akinétique par un tissu vivant repeuplé de nouveaux cardiomyocytes ayant des caractéristiques contractiles,
- (ii) stopper ou faire diminuer le remodelage,
- (iii) augmenter l'angiogenèse locale ainsi que la perfusion régionale pour limiter la mort des cardiomyocytes résidents,
- (iv) recruter des cellules souches cardiaques résidentes ou circulantes pour améliorer la reconstruction fonctionnelle de la zone myocardique détruite.

Dans cette optique, de nombreux types cellulaires ont été testés. Cependant leur légitimité en tant que candidat à la thérapie cellulaire n'est pas si évidente. A défaut de remplir toutes les conditions énumérées ci-dessous, ces cellules peuvent néanmoins servir de modèles soit en recherche fondamentale pour permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques, soit pour la recherche de nouveaux médicaments. Le type cellulaire idéal pour une utilisation en thérapie, s'il existe, n'a pas encore été découvert. Les critères à prendre en compte dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'une cellule sont :

- (i) la facilité d'isolement à partir du tissu source,
- (ii) une caractérisation aisée,

- (iii) un pouvoir d'expansion *in vitro* sans perte des capacités biologiques initiales ou la capacité à les isoler en grande quantité sans nécessité de les mettre en culture,
- (iv) les capacités de différenciation,
- (v) la voie d'administration,
- (vi) l'acceptation par l'organisme du receveur en termes d'intégration dans le tissu hôte et de tolérance immunologique.

3.2. Principaux types cellulaires utilisés

Une des premières approches de thérapie cellulaire cardiaque décrite a consisté à transplanter des myoblastes avec l'espoir que ces derniers allaient se transdifférencier en cardiomyocytes et s'intégrer au myocarde. Malgré certains effets positifs rapportés sur la fonction cardiaque chez le rongeur (Taylor *et al.* 1998) et chez la brebis (Ghostine *et al.* 2002), il a été montré que les myoblastes ne se transdiffénciaient pas en cardiomyocytes (Reinecke *et al.* 2002) et ne se couplaient pas électriquement avec le tissu d'origine (Rubart *et al.* 2004). Par la suite, un essai clinique de phase I a été mené chez l'homme dans lequel aucune amélioration de la fonction cardiaque n'a pu être mise en évidence. Au contraire, un nombre plus important de troubles rythmiques est apparu dans le groupe traité avec les myoblastes (Menasche *et al.* 2008).

Une alternative aux myoblastes a été l'utilisation des CSH et des CSM de la MO qui dans un premier temps ont nourri de très grands espoirs. En effet, les cellules souches de la MO, qui remplissent plusieurs des conditions décrites ci-dessus, ont été rapportées comme dotées d'un très grand potentiel de transdifférenciation, notamment dans le cœur de rongeurs, en améliorant la fonction du ventricule gauche par formation de nouveaux cardiomyocytes (Jackson *et al.* 2001; Orlic *et al.* 2001). L'enthousiasme autour des CSH et CSM s'est accru après la publication d'analyses post-mortem de patients ayant reçu une transplantation cardiaque. Des cardiomyocytes portant le chromosome Y ont été retrouvés après transplantation de cœurs issus de donneurs féminins dans des receveurs masculins (Quaini *et al.* 2002) suggérant une origine extracardiaque des cardiomyocytes néoformés. Des données similaires de chimérisme cardiaque ont été décrites après transplantation de MO chez des receveuses, mais en quantité moindre (Deb *et al.* 2003). Depuis, ces travaux ont été remis en question par manque de reproductibilité (Balsam *et al.* 2004; Murry *et al.* 2004) et des études ultérieures ont suggéré que les évènements initialement interprétés

comme de la transdifférenciation étaient en réalité une conséquence de phénomènes de fusion survenant entre les cellules transplantées et les cardiomyocytes résidents (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Nygren *et al.* 2004; Terada *et al.* 2002). Ces deux mécanismes (transdifférenciation et fusion cellulaire) restent à l'heure actuelle toujours débattus en terme d'efficacité régénérative car quand ils surviennent *in vivo*, c'est à des fréquences extrêmement faibles (<1%, (Balsam *et al.* 2004; Jackson *et al.* 2001; Nygren *et al.* 2004) (Planat-Benard *et al.* 2004a)).

3.3. Essais cliniques

Malgré ces résultats discordants en terme d'impact physiologique, de nombreux essais cliniques utilisant des infusions de MO, purifiées ou pas, dans le traitement de l'IDM ou de l'insuffisance cardiaque ont été réalisés dès 2002 (Strauer *et al.* 2002). Certains de ces essais ont montré un effet bénéfique modeste (3% en moyenne sur 10 essais (Lipinski *et al.* 2007)) et souvent transitoire sur la fonction cardiaque alors que d'autres n'ont pas pu mettre en évidence de différences significatives entre le groupe traité et le groupe contrôle. Le caractère transitoire des effets bénéfiques observés met en avant l'absence de régénération myocardique (que ce soit par transdifférenciation ou par fusion). De plus, les cellules souches sont difficilement détectables dans le cœur infarcté à très court terme, c'est pourquoi les bénéfices constatés ont été attribués aux effets paracrines médiés par les cellules souches. Parmi ces effets, les cellules transplantées sont capables de sécréter des facteurs solubles qui vont avoir une action sur la protection des cardiomyocytes face à l'apoptose induite par l'ischémie, sur la néoangiogenèse, sur la fibrose et sur l'inflammation. Par ailleurs, les essais cliniques de thérapie cellulaire réalisés jusqu'à présent restent difficilement comparables entre eux à cause des nombreuses différences relevées dans les protocoles utilisés. En effet, chaque protocole propose une fenêtre temporelle d'injection, un type cellulaire et une quantité de cellules différents (Tableau 3). Quant à la voie d'injection, elle peut être intra-coronaire ou intra-myocardique.

Etude	Type cellulaire	Nombre de patients	Voie d'injection	Résultat FEVG% Δ	Référence
TOPCARE-AMI	BMC	9	IC	+8,3 (4 mois) +9,3 (12 mois)	Schachinger V et al. (2004) <i>J. Am. Coll. Cardiol.</i> 44:1690-1699
BOOST	BMC	60	IC	+6,0 (6 mois) N.S. (18 mois)	Wollert KC et al. (2004) <i>Lancet</i> 364:141-148
REPAIR-AMI	BMC	204	IC	+2,5 (4 mois)	Schachinger V et al. (2006) <i>N. Engl. J. Med.</i> 355:1210-1221
MAGIC Cell-3-DES	PBSC	82	IC \pm mobilisation périphérique	+5,1 (6 mois)	Kang HJ et al. (2006) <i>Circulation</i> 114:1145-1151
ASTAMI	BMC	100	IC	NS (6 mois)	Lunde K et al. (2006) <i>N. Engl. J. Med.</i> 355:1199-1209
MAGIC	SMB	97	IM	NS (6 mois)	Menasche P et al. (2008) <i>Circulation</i> 117:1189-1200
BONAMI	BMC	101	IC	NS (3 mois)	Roncalli J et al. (2011) <i>Eur Heart J</i> 32:1748-1757

Tableau 3. Sélection d'essais cliniques de thérapie cellulaire cardiaque. BMC, *bone marrow cells*; PBSC, *peripheral blood stem cells*; SMB, *Skeletal myoblast*; IC, intracoronaire; IM, intramyocardique; FEVG% Δ , différence en pourcentage de la fraction d'éjection du ventricule gauche; NS, non significatif. Adapté de (Flynn et O'Brien 2011; Hansson *et al.* 2009).

3.4. Autres voies de recherche

3.4.1. Sources alternatives de cellules

Face à ces résultats décevants, des recherches parallèles visant à identifier des cellules souches ou des progéniteurs cardiaques à haut potentiel de régénération cardiomyogénique ont été entreprises. Par ailleurs des études tendent à prouver qu'il existe un renouvellement limité des cardiomyocytes dans le cœur des mammifères au cours de la vie suggérant l'existence de ces cellules souches (Bergmann *et al.* 2009; Drenckhahn *et al.* 2008; Hsieh *et al.* 2007). Plusieurs équipes ont depuis identifié des populations de cellules cardiaques apparemment souches, sur la base de l'expression des marqueurs de surface c-kit (Beltrami *et al.* 2003) et Sca-1 (Oh *et al.* 2003) ou sur leur capacité à effluer le Hoechst 33342 (Martin *et al.* 2004). Etant donné que ces cellules sont capables de se différencier en cardiomyocyte, en cellules endothéliales et musculaires lisses et peuvent être isolées et amplifiées *in vitro*, elles représentent des candidates intéressantes pour la régénération myocardique (Messina *et al.* 2004; Torella *et al.* 2004; Urbanek *et al.* 2005). Cependant à l'heure actuelle, aucun consensus n'a pu être trouvé sur l'identification formelle de ces différentes populations. En outre le potentiel *in vivo* de

ces cellules en termes de recrutement, d'expansion et de différenciation reste à déterminer (Hansson *et al.* 2009; Krause *et al.* 2010).

Une autre alternative pour la thérapie cellulaire est l'injection de cardiomyocytes (ou progéniteurs cardiaques) dérivés de la différenciation de cellules ES. En effet, les milieux utilisés pour différencier des cellules ES en cardiomyocytes sont de mieux en mieux définis. Les cardiomyocytes dérivés de cellules ES présentent l'ultrastructure et l'activité électromécanique de cardiomyocytes fœtaux (Kehat *et al.* 2001; Mummery *et al.* 2003). Cette stratégie visant à pré-différencier les cellules ES a pour but non seulement d'engager les cellules vers la voie cardiomyogénique mais également d'éviter une croissance incontrôlée des cellules indifférenciées en vue de la transplantation. En effet, le risque de formation de tératomes est une des restrictions à l'utilisation des cellules ES malgré un fort potentiel de régénération myocardique mis en évidence chez le rat (Hodgson *et al.* 2004; Laflamme *et al.* 2007; Tomescot *et al.* 2007). Les autres limitations liées à l'utilisation des cellules ES sont :

- (i) la possibilité de séparer à haut rendement et avec une spécificité élevée les cellules engagées dans la voie cardiaque,
- (ii) l'aspect immunogène de ces cellules en allotransplantation,
- (iii) les considérations éthiques liées à la production de lignées humaines (Annexe).

Bien que les nouvelles voies de recherche sur les iPS soient en plein essor, des limites importantes rendent leur utilisation en thérapie cellulaire difficile. La première concerne, à l'instar des cellules ES, le risque tératogène inhérent à la présence de cellules très indifférenciées et le deuxième a été mis en évidence récemment et concerne le rejet immunologique de ces cellules après injection dans un animal syngénique (Zhao *et al.* 2011). Cependant, dernièrement, une équipe est parvenue à reprogrammer une cellule somatique directement en cardiomyocytes grâce à la transfection de trois facteurs selon un procédé proche de celui employé par Yamanaka *et al.* en 2006 (Ieda *et al.* 2010). Cette reprogrammation directe des cellules en cardiomyocytes, sans passer par un stade pluripotent, présente un bon rendement et permet de s'affranchir de l'étape de différenciation obligatoire des iPS vers le type cellulaire somatique d'intérêt. Néanmoins, si les cellules obtenues de cette manière ne présentent pas de risque tératogène lié à la pluripotence, l'intégration des transgènes comporte toujours des risques tumorigènes.

Lors d'un IDM classique, la perte cardiomyocytaire est estimée à un milliard de cellules (Laflamme *et al.* 2005). Par conséquent, quelque soit la cellule utilisée en

thérapie cellulaire, elle devra être produite en très grande quantité et purifiée facilement. C'est pourquoi il faut poursuivre l'exploration des tissus à la recherche de nouvelles cellules plus performantes et améliorer qualitativement et quantitativement la sélection et la production de cellules. Dans ce but, les techniques de caractérisations phénotypiques et fonctionnelles et de purification des cellules d'intérêt sont à poursuivre.

3.4.2. Voies d'administration et amélioration de la survie cellulaire

Une autre question primordiale pour l'efficacité des cellules souches en thérapie cellulaire concerne la voie d'administration des cellules dans le myocarde. La particularité de cet organe est la répétition et la fréquence de ses mouvements qui entraînent des modifications de pression et de forme à l'intérieur du tissu. L'injection intramyocardique (IM) permet de délivrer les cellules directement au site de la lésion mais cette méthode reste invasive et lourde (opération à cœur ouvert) et peut être sujette à une élimination rapide et à une distribution non homogène des cellules (Hamdi *et al.* 2009). Moins invasive est l'injection intracoronaire à l'aide d'un cathéter mais cette technique a montré une capacité de prise de greffe des cellules injectées très faible (Hou *et al.* 2005). L'injection endocardique est également moins invasive que l'injection IM mais nécessite un guidage par repérage électromécanique pour être réalisée (Moscoso *et al.* 2009). Enfin l'injection intraveineuse met à contribution la capacité des cellules à migrer vers la zone lésée qui attire les cellules circulantes par relargage systémique de facteurs trophiques. Néanmoins la proportion des cellules atteignant la zone infarctée est très faible et les cellules sont disséminées dans tout l'organisme (Freyman *et al.* 2006). Malgré ces différentes technologies actuellement disponibles, il est difficile de dépasser une prise de greffe des cellules supérieure à 11% des cellules injectées chez la truie 1 heure après inoculation des cellules (Hou *et al.* 2005) et 15% chez le rongeur 12 semaines après injection (Muller-Ehmsen *et al.* 2002).

Parmi la fraction de cellules retenues dans le tissu cardiaque, près de 90% meurent dans les jours qui suivent l'injection (Laflamme et Murry 2005; Muller-Ehmsen *et al.* 2002). Cette mort cellulaire est un phénomène multifactoriel où interviennent essentiellement l'apoptose, mais également la réponse inflammatoire due aux injections elles-mêmes, l'hypoxie en relation avec la faible vascularisation des zones infarctées et la perte des interactions avec la MEC cardiaque (Skuk *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2004). Plusieurs stratégies sont envisageables pour augmenter la survie des cellules transplantées. La vascularisation du greffon et du tissu hôte peut être améliorée en associant l'injection de cellules souches à des facteurs angiogéniques comme l'HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*)

(Azarnoush *et al.* 2005) ou le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Yau *et al.* 2005). Par ailleurs les cellules souches injectées peuvent également être manipulées afin d'augmenter leur résistance à la mort cellulaire par expression de facteurs favorisant la survie et la prolifération comme Akt, facteur impliqué dans la voie de signalisation des phosphatidylinositol 3-kinases (Gnecchi *et al.* 2005) ou Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), une protéine anti-apoptotique (Kutschka *et al.* 2006). Enfin, une possibilité consiste à reconstruire *ex vivo* une matrice contractile servant de support aux cellules. Ces matrices doivent reproduire au mieux le tissu à reconstruire (biomimétisme) tout en guidant le développement des cellules greffées et en facilitant leur vascularisation et leur intégration au sein du tissu hôte. Des colles à base de fibrine ou des solutions de collagène ont déjà été utilisées (Christman *et al.* 2004). Le dernier point qui finalisera la greffe cellulaire concerne l'intégration du greffon au tissu hôte par un couplage électromécanique au syncytium fonctionnel par des jonctions de type gap mais également aux autres cellules présentes dans le cœur.

3.5. Mécanismes de régénération médiés par les CSA : exemple du cœur

Au cours de ces dernières années, les études réalisées sur le petit animal ainsi que les essais cliniques chez l'homme ont renforcé l'idée que la thérapie cellulaire du tissu cardiaque était envisageable. Cependant bien que certaines données à court terme soient encourageantes, de nombreux points restent à éclaircir, principalement concernant les mécanismes sous-jacents impliqués dans les modestes effets bénéfiques constatés. L'activation du pool de cellules souches cardiaques endogènes ne semble pas être en mesure de répondre de manière efficace aux dommages liés à l'IDM. C'est pourquoi plusieurs autres phénomènes ont été proposés. Les mécanismes présentés ci-après sont basés sur l'existence d'évènements de transdifférenciation des cellules souches en tissu cardiaque et/ou de fusion entre les cellules souches et les cardiomyocytes résidents avec des conclusions en terme de signification biologiques débattues. Néanmoins au vu du faible nombre de cellules qui persistent sur le site lésionnel, il semblerait que ces processus ne puissent expliquer entièrement les bénéfices enregistrés d'où le récent mécanisme envisagé, la diffusion de facteurs paracrines.

3.5.1. Effets paracrines et régénération cardiaque

Devant les résultats discordants des études *in vivo* montrant une amélioration structurelle et de fonction du cœur mais une prise de greffe très faible des cellules injectées, plusieurs hypothèses ont été mises en avant et regroupées sous le terme d'effets paracrines. Il s'agit de mécanismes régis par l'action de différentes cytokines et de facteurs de croissance sécrétés par les cellules souches qui vont avoir un rôle dans les processus de protection cellulaire contre l'apoptose, d'angiogenèse, de remodelage et de régénération.

Des types variés de cellules souches, ayant démontré un effet thérapeutique, ont montré un potentiel de sécrétion de molécules à effets paracrines. On peut citer les cellules souches de la MO (CSM et CSH), les cellules souches circulantes (cellules souches/progénitrices endothéliales) et les cellules souches cardiaques (Burchfield et Dimmeler 2008). La mise en évidence de ces molécules solubles a été faite par Kinnaird *et al.*, qui dans une série d'études ont analysé par ELISA le milieu de culture de CSM murines et ont détecté la présence de quantités importantes de facteurs angiogéniques tels que le VEGF, le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), le PGF (*placental growth factor*) et le MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (Kinnaird *et al.* 2004). Ce milieu conditionné a permis une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales et musculaires lisses *in vitro* de manière dose dépendante.

Protection myocardique, survie cellulaire et néovascularisation

In vivo, l'injection des CSM dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez la souris a montré un effet angiogénique corrélé à la sécrétion de facteurs solubles par les CSA. Depuis cette étude, la littérature sur les facteurs paracrines s'est sensiblement étoffée et de nouvelles molécules ont été identifiées. Plus particulièrement concernant le cœur, le milieu conditionné de cellules souches de la MO, récolté en condition d'hypoxie, a été rapporté comme contenant la protéine impliqué dans la voie de signalisation de la survie cellulaire Akt, le facteur proangiogénique VEGF et l'agent chimio-attractant SDF-1 (Uemura *et al.* 2006). L'injection dans des cœurs infarctés de ces cellules souches de la MO préconditionnées en milieu hypoxique s'est traduite par une augmentation de la fraction d'éjection et une diminution de la zone infarctée malgré une très faible quantité de cellules retrouvées dans la zone péri-infarctée. Le caractère cytoprotecteur (anti-apoptotique) d'Akt a été mis en évidence par sa surexpression dans des CSM cultivées en hypoxie (Gnecchi *et al.* 2006). Le milieu conditionné contenant Akt a inhibé l'apoptose de cardiomyocytes isolés et conservés en conditions d'hypoxie. En outre l'injection des CSM génétiquement

modifiées pour surexprimer Akt a réduit la taille d'infarctus de manière significative dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le rongeur.

Remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque

En plus des effets angiogéniques et anti-apoptotiques, les facteurs paracrines ont une action sur le remodelage myocardique post-infarctus. La transplantation de CSM a permis une réduction de l'expression des metalloprotéases de la matrice -1 et -9 (MMP-1 et 9) ce qui se traduit par une diminution de la fibrose (Nagaya *et al.* 2005), et une réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans le remodelage du ventricule gauche comme le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), l'IL-1 α (interleukine-1 α) et l'IL-6 (interleukine-6) (Guo *et al.* 2007).

Mobilisation de cellules souches ou de progéniteurs endogènes

Après lésion d'un organe, des cellules souches/progénitrices endogènes sont capables de se mobiliser et de remonter un gradient de concentration chimioattractant pour rejoindre le site lésionnel. C'est notamment le cas des cellules progénitrices endothéliales qui, à partir de la MO et du sang périphérique vont remonter la circulation sanguine en suivant un gradient de SDF-1 pour atteindre le tissu cardiaque ischémié. Une fois sur place, ces cellules vont à leur tour sécréter des facteurs paracrines qui vont atténuer l'apoptose et stimuler l'angiogenèse des cellules endothéliales présentes dans le cœur (Urbich *et al.* 2005; Yang *et al.* 2010). Les autres cellules souches endogènes capables d'adopter un profil paracrin sont les cellules souches cardiaques. Les données confortant cette hypothèse ont été recueillies *in vitro* sur des milieux conditionnés provenant de cardiosphères et de cellules dérivées de cardiosphères qui ont permis une meilleure survie de cardiomyocytes isolés maintenus en hypoxie d'une part, et d'autre part ont favorisé la formation d'un réseau tubulaire à partir des progéniteurs endothéliaux dérivés des HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) (Chimenti *et al.* 2010). Ces effets attribués au VEGF et à l'HGF (*hepatocyte growth factor*) ont également été étudiés *in vivo* après injection des cellules isolées dans un modèle murin d'infarctus du myocarde. Outre ces deux facteurs de croissance, l'IGF-1 (*insulin growth factor-1*) et Akt, qui sont des facteurs de survie, ont été détectés et une baisse d'expression de la caspase 3, impliquée dans l'apoptose a été induite. En plus de la stimulation de l'angiogenèse et de l'amélioration de la survie des cellules du tissu cardiaque, il a été également rapporté que les cellules injectées activent les cellules souches cardiaques résidentes comme démontré par l'augmentation du nombre de cellules cKit⁺ et Nkx2.5⁺ dans la zone bordante de

l'infarctus. Néanmoins les molécules solubles responsables de cette activation n'ont pas été formellement identifiées.

Les effets paracrines actuellement connus agissant dans la régénération cardiaque sont résumés dans la Figure 10.

L'étude des effets paracrines n'en est qu'au commencement et d'innombrables molécules identifiées par microarray différentielle (Urbich *et al.* 2005) et potentiellement utilisables devront être étudiées afin de pouvoir exploiter au mieux les possibilités offertes par cette nouvelle voie dans la thérapie cellulaire cardiaque.

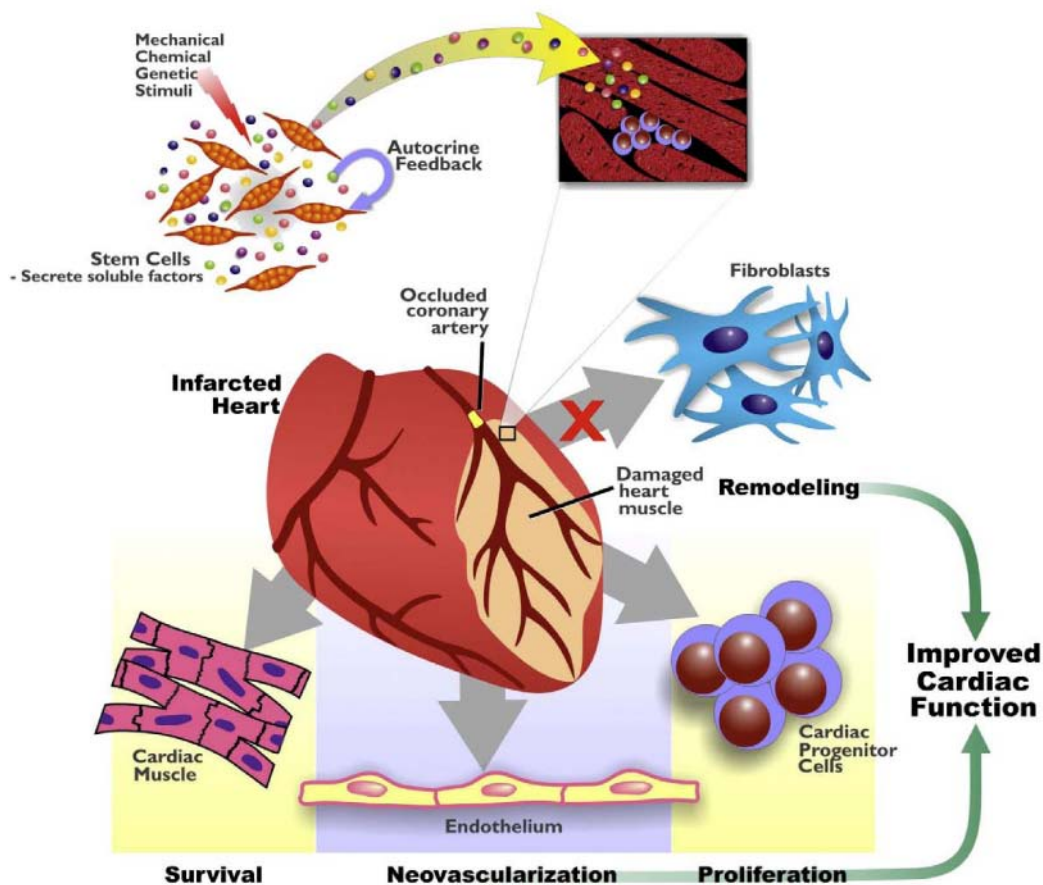


Figure 10. Effets des facteurs paracrines dans la régénération myocardique. En réponse à des stimuli environnementaux, les cellules souches relarguent des facteurs solubles qui vont affecter le microenvironnement cardiaque. Ces molécules biologiquement actives exercent de multiples effets sur les cellules résidentes. Ces effets aboutissent à la protection, la réparation et la régénération du tissu grâce à des actions sur la survie cardiomyocytaire, sur la néovascularisation et le remodelage de la zone infarctée et sur la prolifération des cellules souches cardiaques. Les cellules souches injectées sont aussi capables d'avoir un effet autocrin qui va jouer sur leur autorenouvellement et leur expansion. D'après (Mirotsou *et al.* 2011).

3.5.2. Fusion ou transdifférenciation ?

Alors qu'un consensus existe sur le fait que les CSA résidentes d'un tissu régénèrent ce dernier en cas de lésion, le débat reste vif sur la possibilité d'engagement *in vivo* de ces cellules souches vers une voie différente de leur tissu d'origine (Mezey 2011). Selon un dogme classique en biologie du développement, au cours de l'embryogenèse, l'engagement dans une voie de différenciation semble réellement exclusif et aucun écart n'est toléré. Par contre, chez l'adulte des études suggèrent que la spécificité de tissu ne soit pas aussi restrictive et que les CSA soient plus flexibles que présumées (Leri *et al.* 2005; Phinney et Prockop 2007; Rovo et Gratwohl 2008). Ce comportement flexible a été renseigné comme une transdifférenciation que l'on peut désigner comme le franchissement de la barrière de lignage d'une cellule souche aboutissant à la formation d'une cellule différenciée différente des lignées présentes dans son tissu d'origine. Un terme équivalent à l'apparition d'un nouveau phénotype est le terme reprogrammation. Certains auteurs qualifient ce phénomène de plasticité et réservent le terme de transdifférenciation au franchissement de feuillet embryonnaire (Rovo et Gratwohl 2008). Dans ce manuscrit, nous utiliserons les termes de transdifférenciation et de plasticité de manière équivalente pour référer au changement de lignage qu'il fasse ou non partie du même feuillet embryonnaire.

Plasticité cellulaire

La plasticité implique de profonds changements dans l'expression génique se traduisant par des modifications de la chromatine et de la structure du noyau. Plusieurs théories sont envisageables pour expliquer l'apparition de nouveaux phénotypes. La conversion vers un nouveau lignage pourrait se produire par l'activation directe d'un programme de différenciation dormant (Figure 11A). Cette hypothèse de conversion directe ou reprogrammation directe, mal décrite pour les cellules souches, a déjà été vérifiée en utilisant des cellules différenciées issues d'un progéniteur ou précurseur commun, ce qui peut avoir une influence quant au nombre de gènes restreints impliqués dans la conversion. En effet il est possible de convertir des cellules B en macrophages par l'expression de deux facteurs de transcription de la même famille (Xie *et al.* 2004). La production de cellules β du pancréas peut également être accomplie à partir de cellules pancréatiques exocrines, toujours par l'expression sélective de plusieurs facteurs de transcription (Zhou *et al.* 2008). Ces résultats de transdifférenciation de cellules matures ont été obtenus *in vitro* dans des conditions expérimentales inductrices. Néanmoins, un tel phénomène n'a jamais été mis en évidence *in vivo*. Malgré l'absence de relevance

physiologique *in vivo*, ces modèles nous facilitent la compréhension des mécanismes impliqués dans la plasticité des cellules et nous permettent de mieux appréhender le modèle plus complexe mettant en jeu les cellules souches.

L'autre mécanisme de transdifférenciation fait intervenir une cellule plus primitive (progénitrice ou souche) qui est générée par dédifférenciation de la cellule somatique vers une cellule plus immature suivie d'une différenciation dans la nouvelle lignée (Figure 11B). Ce modèle de dédifférenciation, a été mis en évidence dans la régénération du cristallin chez le triton (Tsonis *et al.* 2004). Lorsque le cristallin est enlevé, les cellules épithéliales pigmentées de l'iris perdent leur pigmentation et changent de forme. La protéine du rétinoblastome est inactivée par hyperphosphorylation ce qui permet à la cellule de se dédifférencier et de ré-entrer en phase de cycle pour proliférer. Lorsque la quantité de cellules dédifférenciées est suffisante, le programme de différenciation en cellules du cristallin est activé et le tissu est reformé. Bien que ce phénomène de reprogrammation ait été observé à partir d'une cellule différenciée, il est plausible d'imaginer le même mécanisme avec une cellule souche adulte qui serait capable de remonter vers un stade plus indifférencié pour activer un programme différent de celui ou ceux de son lignage initial (Figure 11C).

Dans le cadre de la régénération cardiaque, ce mécanisme de dédifférenciation a été observé chez le poisson zèbre (Poss *et al.* 2002; Raya *et al.* 2003). Après résection partielle du myocarde, le sarcomère des cardiomyocytes est désassemblé et ce mécanisme est accompagné d'une diminution de l'expression des gènes sarcomériques comme la chaîne lourde de la myosine ventriculaire (Jopling *et al.* 2010). Les cardiomyocytes ré-expriment des régulateurs positifs du cycle cellulaire et des voies de signalisation impliquées dans la prolifération pour reformer le tissu manquant (Lepilina *et al.* 2006; Lien *et al.* 2006). Il faut cependant noter que cette dédifférenciation implique des cardiomyocytes qui vont redonner des cardiomyocytes. Il ne s'agit donc pas de transdifférenciation au sens décrit ci-dessus (franchissement de lignage). Toutefois, ce processus fait appel à une étape de dédifférenciation suivie d'une étape de différenciation. Cet exemple de reprogrammation ouvre des perspectives intéressantes pour identifier des gènes responsables de ces phénomènes et contribue à mieux comprendre les processus de différenciation myocardique.

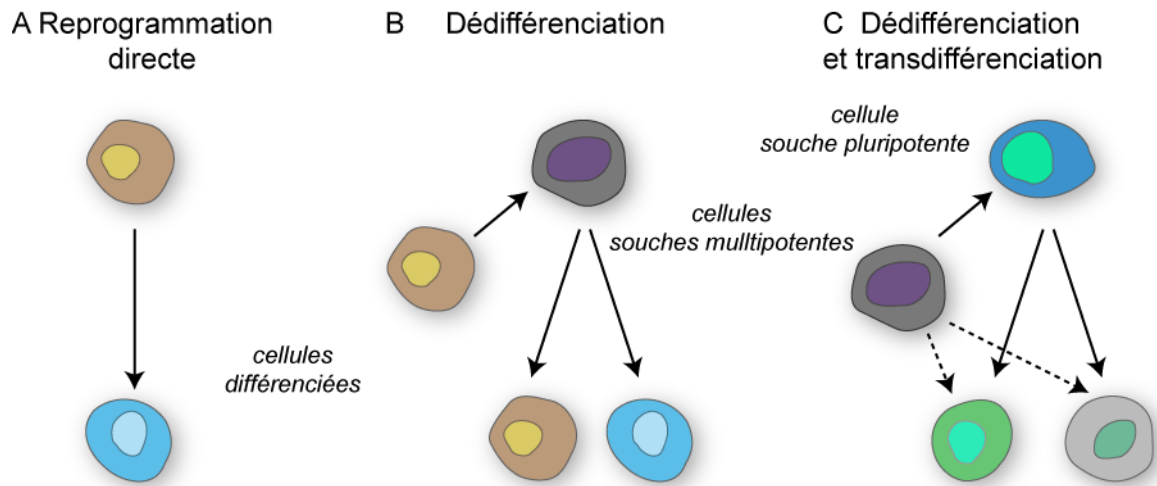


Figure 11. Mécanismes connus ou supposés d'apparition de nouveaux phénotypes. (A) Une cellule différenciée d'un tissu produit une cellule différenciée différente appartenant au même tissu par reprogrammation directe. **(B)** Une cellule différenciée va se dédifférencier en cellule souche multipotente ou progéniteur pour redonner une cellule différenciée identique ou appartenant au même tissu. **(C)** Une cellule souche multipotente va se dédifférencier en cellule souche pluripotente pour donner des cellules différenciées appartenant à un lignage différent ou bien le franchissement de lignage se fait directement, sans intermédiaire pluripotent. Adapté de (Jopling *et al.* 2011; Wagers et Weissman 2004).

Plasticité des cellules souches et régénération myocardique

En ce qui concerne la transdifférenciation impliquant les cellules souches, les mécanismes ne sont pas élucidés et les méthodes de différenciation *in vitro* sont difficiles à mettre en œuvre au vu des multiples facteurs impliqués et des effets encore méconnus de certaines molécules. Cependant, les exemples de plasticité *in vivo* foisonnent dans la littérature et se rapportent à de nombreux tissus et organes. Parmi les données les plus marquantes, la plasticité après injection de CSH dans le SNC est un bon exemple illustrant la controverse à propos de ce phénomène. Les CSH ont été décrites comme pouvant se différencier en cellules de la microglie et de la macroglie qui ont été retrouvées à travers tout le cerveau que ce soit en conditions normales ou pathologiques (Djukic *et al.* 2006; Eglitis et Mezey 1997; Tanaka *et al.* 2003). Ces observations ont été acceptées par la majorité de la communauté scientifique. En revanche, l'apparition de phénotypes neuronaux après la transplantation de CSH (Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2003) a été fortement critiquée que ce soit après injection de MO totale ou bien de populations isolées (Castro *et al.* 2002; Roybon *et al.* 2006).

Dans le myocarde, les événements de transdifférenciation des cellules souches ont été à la fois abondamment décrits et remis en cause. La première étude d'injection de

cellules de la MO dans le cœur infarci a montré des résultats surprenants allant jusqu'à 68% de la zone infarctée colonisée par des cardiomyocytes néoformés, neuf jours après transplantation des cellules (Orlic *et al.* 2001). Dans ce modèle, les souris femelles receveuses ont reçu des cellules issues de donneurs mâles exprimant l'eGFP. Cette approche a permis d'identifier les cellules néoformées par l'expression de cette protéine fluorescente et par la présence du chromosome Y. D'autres travaux utilisant des populations cellulaires de la MO ont renforcé cette hypothèse *in vitro* (Eisenberg *et al.* 2003) ou *in vivo* (Jackson *et al.* 2001), tout en excluant l'influence des effets paracrines angiogéniques (Kajstura *et al.* 2005).

Cependant, à l'aide de méthodes d'investigation différentes, ces résultats ont été remis en cause par plusieurs auteurs qui ont décrit, soit une absence de transdifférenciation cardiomyogénique des CSH (Murry *et al.* 2004), soit des événements de fusion entre les cellules souches et les cardiomyocytes résidents (Nygren *et al.* 2004), soit une différenciation des CSH en cellules hématopoïétiques matures au sein du myocarde infarci (Balsam *et al.* 2004).

Les études de transdifférenciation cardiomyogénique menées avec les CSM sont autant discordantes que celles obtenus avec les CSH ou les cellules souches de la MO, tant au niveau des différenciations *in vitro* que des transplantations *in vivo*.

In vitro, la 5'-azacytidine, un agent déméthylant utilisé pour différencier les CSM en cardiomyocytes avant leur injection a permis l'obtention de myotubes multinucléés (Wakitani *et al.* 1995) capables de se contracter et d'exprimer des marqueurs cardiaques (Makino *et al.* 1999). Cependant, *in vivo*, les résultats de l'injection de CSM traitées à la 5'-azacytidine chez le rongeur après ischémie semblent discordants quant à l'amélioration (Tomita *et al.* 1999) ou non (Olivares *et al.* 2004; Perin *et al.* 2004) de la fonction cardiaque.

Une autre étude a décrit l'intégration au sein du myocarde et l'adoption des phénotypes cardiomyogénique et vasculaire des CSM par transdifférenciation dans le cœur de souris infarci tout en excluant la survenue de processus de fusion (Rota *et al.* 2007). De nouveau, ces résultats de transdifférenciation des CSM n'ont pas été reproduits dans d'autres études, notamment dans un modèle porcin et ce en utilisant 2 populations différentes de CSM dérivées de sang de cordon (Ghodsizad *et al.* 2009). Il a été suggéré que l'amélioration constatée est plutôt à mettre sur le compte des effets paracrines.

Aujourd'hui les résultats sur la transdifférenciation des CSM en cardiomyocytes apparaissent discordants. Néanmoins la plupart des travaux actuels s'accordent à dire que la transdifférenciation des CSM existe mais à un niveau extrêmement faible et donc insuffisante pour expliquer à elle seule le bénéfice régénératoire des cellules souches dans

le cœur. La disparité des résultats obtenus entre les diverses études résulte une fois de plus probablement de la multiplicité des méthodologies mises en œuvre et des moyens d'investigation utilisés (Gruh et Martin 2009). Comme évoqué auparavant, le type cellulaire injecté varie d'une étude à l'autre. Certains emploient des cellules souches dérivées de la MO, une population hétérogène mal définie d'un point de vue phénotypique, alors que d'autres se servent de sous-populations dérivées de cette dernière (Gruh et Martin 2009). De plus, l'emploi de populations mixtes issues de la MO peut conduire à des effets synergiques pouvant introduire un biais dans l'analyse de la transdifférenciation. En prenant l'exemple de cellules souches de la MO, on peut imaginer que certaines sous-populations plus fragiles peuvent être protégées par les effets anti-apoptotiques des CSM injectées de manière concomitante, aboutissant à une surévaluation du potentiel de transdifférenciation. En outre, d'autres cytokines seraient en mesure de favoriser ou d'inhiber directement ce mécanisme, modifiant ainsi le véritable potentiel des cellules injectées. Il est également nécessaire d'être rigoureux sur les critères d'évaluation de la transdifférenciation. En effet, comme dans le cas du traitement à la 5'-azacytidine, ce n'est pas parce qu'une cellule exprime quelques marqueurs cardiaques qu'elle devient pour autant un cardiomyocyte complètement différencié et fonctionnel.

3.5.3. La fusion cellulaire

La fusion cellulaire est un processus physiologique naturel intervenant dès le commencement de la vie par la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule puis plus tard dans la formation des organes (par exemple le muscle squelettique), l'infection virale et la réponse immune (Chen *et al.* 2007; Duelli et Lazebnik 2007; Horsley et Pavlath 2004; Vignery 2008). Au cours des deux dernières décennies, la fusion cellulaire a pris une dimension supplémentaire après la découverte de la capacité des cellules souches à fusionner avec plusieurs types cellulaires appartenant à différents organes (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Johansson *et al.* 2008; Nygren *et al.* 2004; Ogle *et al.* 2005; Stolzing *et al.* 2007; Terada *et al.* 2002; Vassilopoulos *et al.* 2003). Le potentiel de régénération médié par la fusion vient du fait que ce processus peut modifier le programme génétique et donc le destin de la cellule. Après fusion des cytoplasmes suivie ou non de la fusion des noyaux, ces derniers vont interagir et peuvent subir une reprogrammation suivant différentes modalités. *In vitro*, le destin d'une cellule mature peut être dirigé vers l'expression d'un programme plus immature après fusion forcée avec une cellule ES (Cowan *et al.* 2005; Yamanaka et Blau 2010). Après fusion, la cellule somatique a retrouvé des capacités de prolifération et de différenciation similaires à celles de la cellule ES. Une telle reprogrammation peut s'avérer utile dans le cadre de la régénération tissulaire. La

reprogrammation d'un noyau somatique, induite par l'influence de facteurs génétiques issus d'un autre noyau, n'est pas la seule possibilité et des facteurs cytoplasmiques sont également capables de modifier au niveau épigénétique le destin de la cellule (Pomerantz et Blau 2004; Yamanaka et Blau 2010).

Comme pour la transdifférenciation, une explication de la terminologie s'impose au vu des divergences trouvées dans la littérature. Dans ce manuscrit, nous utiliserons les termes de cellule hybride, d'hétérokaryon et de synkaryon tels qu'ils sont définis par Ogle *et al.* (Ogle *et al.* 2005) (Figure 12). Une cellule hybride est un terme générique qui désigne la fusion de deux types cellulaires différents. La fusion permanente des membranes n'est pas obligatoire si bien qu'une cellule contenant des composés cellulaires ou nucléaires issu d'une autre cellule est considérée comme une cellule hybride. Ce phénomène est aussi connu sous le nom de fusion hétérotypique ou hétérologue ; à la différence d'un syncytium qui est le résultat d'une fusion homotypique (entre cellules identiques) et qui possède un nombre de noyaux supérieur ou égal à deux. Plusieurs tissus ont besoin de former des syncytiums par fusion homotypique pour devenir fonctionnels comme le placenta, les os ou les muscles (Huppertz *et al.* 1998; Huppertz *et al.* 2001; Loutit et Nisbet 1982; Taylor 2000; Vignery 2000). Un hétérokaryon est le résultat de la fusion hétérotypique de deux cellules différentes ou plus et qui possèdent deux noyaux distincts ou plus. Un synkaryon résulte de la fusion nucléaire (noyau hybride) des noyaux d'un hétérokaryon (Figure 12).

Avant la découverte des propriétés de fusion de certaines populations cellulaires, la fusion hétérotypique n'était envisagée que de manière expérimentale, à l'aide de virus (Harris et Watkins 1965), d'agents physiques (Zimmermann 1982) ou chimiques (Ahkong *et al.* 1975) permettant une fusion membranaire et aboutissant ou non à une fusion nucléaire. Parmi ces travaux, des études sur des hybrides somatiques entre cellules de rongeurs et cellules humaines avaient pu mettre en évidence un phénomène de complémentation d'une déficience génétique du receveur par un chromosome du donneur (Davis et Adelberg 1973). Après fusion nucléaire et recombinaison aléatoire des chromosomes, on peut assister à une normalisation de la ploïdie excessive par élimination progressive des chromosomes surnuméraires au cours des divisions à l'exception des chromosomes qui apportent une complémentation conférant un avantage sélectif à la cellule (Nora *et al.* 1994).

Parmi les travaux pionniers sur la capacité de fusion *in vivo* des cellules souches de la MO, l'étude d'Alvarez-Dolado *et al.* a été la première à montrer que ces cellules étaient capables de fusionner avec les cellules somatiques de certains tissus. En effet, chez des

animaux sains ayant subi une irradiation suivie d'une injection de cellules de la MO, la présence d'hétérokaryons n'est observée que dans un nombre limité d'organes tels que le foie, le cerveau et le cœur, avec une fréquence extrêmement faible (Alvarez-Dolado *et al.* 2003). Ces résultats suggèrent que les cellules de certains organes sont plus susceptibles de fusionner que d'autres soit à l'état basal soit dans des conditions particulières comme par exemple un stress modéré représenté ici par l'irradiation des animaux.

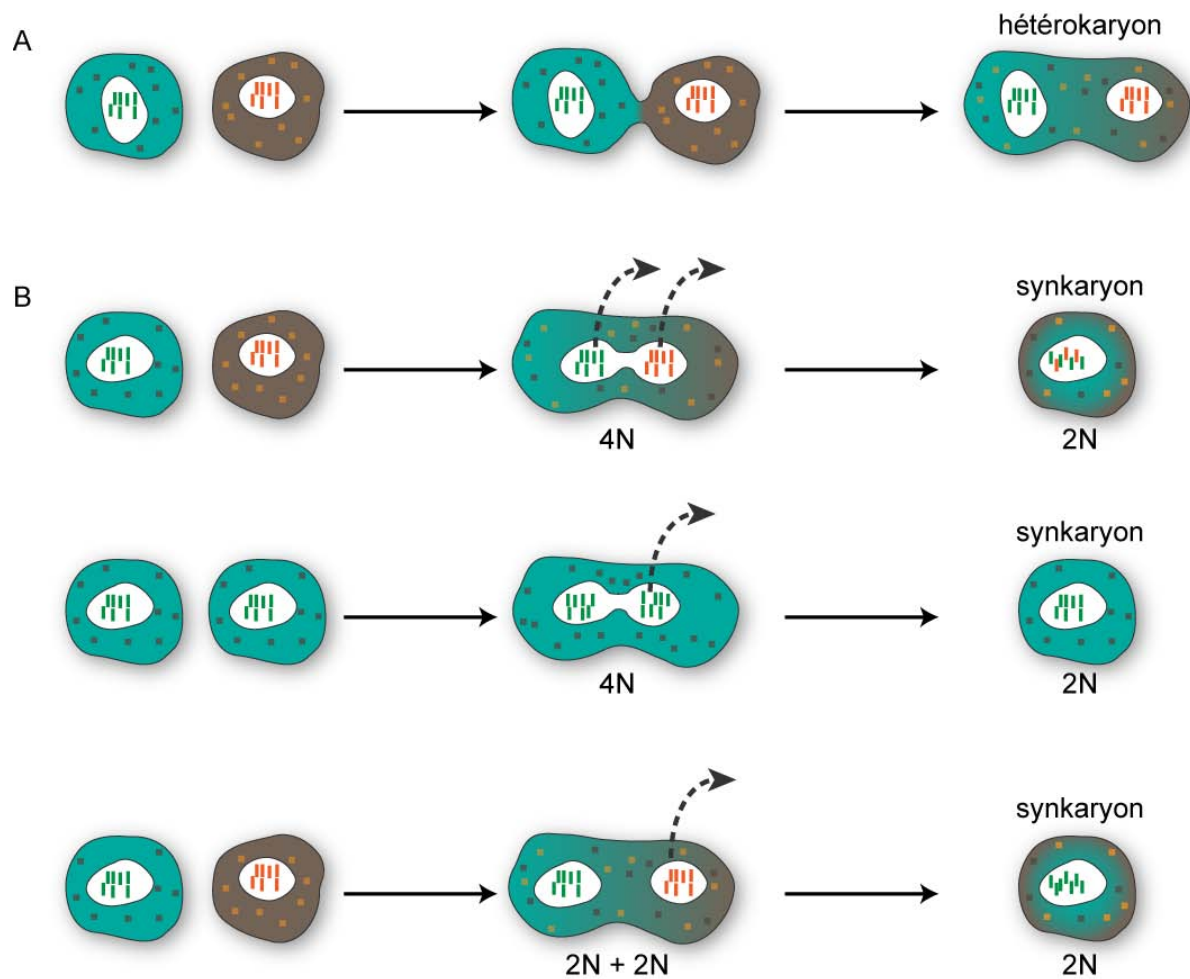


Figure 12. La fusion cellulaire. (A) Les cytoplasmes de deux cellules différentes fusionnent pour donner naissance à une cellule binucléée appelée hétérokaryon. **(B)** Fusion hétérotypique ou homotypique aboutissant à une cellule uninucléée (synkaryon) après fusion ou non des noyaux. Si la fusion nucléaire se produit et après réarrangements chromosomiques, la cellule peut expulser des chromosomes surnuméraires pour retrouver une ploïdie normalisée. Les flèches en pointillés représentent l'expulsion de chromosomes ou d'un noyau. D'après (Ogle *et al.* 2005).

Fusion cellulaire et correction d'un défaut génétique

Les premières découvertes suggérant un rôle de la fusion hétérotypique *in vivo* dans la régénération tissulaire ont été dévoilées par des expériences de transplantation de fibroblastes du derme dans le muscle squelettique de souris mdx, déficientes en dystrophine (Gibson *et al.* 1995). Les fibroblastes se sont intégrés aux myotubes existants pour former des hétérokaryons et ont permis une réexpression de dystrophine. Puis le concept de fusion avec les fibres musculaires a été élargi aux CSA. En effet, l'administration de cellules souches de la MO chez la souris a révélé leur capacité de migration vers un muscle lésé ainsi que leur potentiel de fusion et de restauration de la fonction musculaire (Ferrari *et al.* 1998). Le rétablissement de l'expression de la dystrophine dans la souris mdx a également été montré après fusion des cellules souches de la MO avec le muscle squelettique (Bittner *et al.* 1999; Gussoni *et al.* 1999). Il est intéressant de noter que dans toutes ces études, aucun évènement de fusion n'a été détecté après injection de cellules dans un muscle sain évoquant l'hypothèse que la fusion cellulaire pourrait constituer une modalité régénérative.

Le processus de fusion des CSA dans le contexte d'un défaut génétique a été beaucoup documenté dans le cadre de la régénération hépatique. Deux groupes indépendants ont utilisé un modèle de souris présentant une tyrosinémie létale induite par une déficience génétique de la fumarylacétoacétate hydrolase (Fah^{-/-}) (Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). Les travaux de ces deux groupes ont montré que les souris non traitées par le 2-(2-nitro-4-trifluoro-méthylbenzoyl)-1,3 cyclohexanedione (NTBC) qui meurent normalement d'insuffisance hépatique, survivent après injection de cellules souches de la MO. Les animaux présentent une fonction hépatique rétablie consécutive à la repopulation de leur foie par des hépatocytes exprimant le gène sauvage Fah. Malgré le faible nombre d'évènements fusionnels détectés, la population de cellules fusionnées qui présentait la correction du défaut génétique a été sélectionnée et a proliféré grâce à son avantage sélectif. De plus les travaux de Wang (Wang *et al.* 2003) montrent qu'une partie des hépatocytes hybrides qui ont initialement une ploïdie excessive retrouvent progressivement un nombre physiologique de chromosomes. Les auteurs suggèrent que l'élimination chromosomique fait intervenir un processus de division réductionnelle sans pour autant le démontrer formellement.

Fusion cellulaire et stress, lésion ou nature de l'organe

De manière concomitante aux travaux d'Alvarez-Dolado *et al.* sur la fusion des cellules de la MO chez la souris (Alvarez-Dolado *et al.* 2003), une étude est venue

confirmer ces données chez l'homme, dans le cervelet d'une patiente ayant reçu une greffe de MO d'un donneur masculin (Weimann *et al.* 2003a). Certains neurones de Purkinje du cervelet de la receveuse étaient tétraploïdes et contenaient des chromosomes à la fois de la receveuse et du donneur. La preuve que la fusion a entraîné une reprogrammation du noyau hématopoïétique pour exprimer des gènes spécifiques des neurones de Purkinje a été rapportée un peu plus tard dans un modèle murin (Weimann *et al.* 2003b). Il a été montré la présence d'hétérokaryons binucléés dont le noyau issu de la cellule hématopoïétique a changé de conformation pour adopter celle du noyau neuronal.

Alors que le muscle squelettique sain n'est pas sujet à la fusion avec des cellules de la MO (Bittner *et al.* 1999), un muscle stressé ou lésé de manière mécanique induit une régénération par fusion avec des cellules de la MO (Doyonnas *et al.* 2004; LaBarge et Blau 2002). Ces études sur le muscle squelettique de la souris (mdx et sauvage) associées aux résultats d'Alvarez-Dolado (Alvarez-Dolado *et al.* 2003) ont permis d'élargir la prospection de la fusion au muscle cardiaque. Plusieurs modèles ont été utilisés dont la souris mdx dans laquelle la capacité des cellules souches à fusionner avec les cellules résidentes pour former des cardiomyocytes corrigés génétiquement a été mise en évidence (Payne *et al.* 2005).

La correction du défaut génétique n'est pas la seule modalité faisant intervenir la capacité de fusion des CSA et l'ischémie cardiaque est un facteur induisant une fusion des cellules souches et des cardiomyocytes (Nygren *et al.* 2004; Spees *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2004). Au sein du myocarde traité, des cellules musculaires multinucléées contenant des noyaux hématopoïétiques ont été détectées (Nygren *et al.* 2004). Ce résultat a été remis en question par deux études qui ont avancé le fait que les CSH injectées étaient bien retrouvées dans le cœur mais sous la forme de cellules hématopoïétiques et qu'aucune cellule musculaire ne contenait de noyau issus du de la MO (Balsam *et al.* 2004; Murry *et al.* 2004). Cependant ces discordances peuvent être expliquées si la cellule issue de la fusion a formé un synkaryon qui est difficilement détectable lorsque les cellules sont délivrées de façon autologue.

Fusion cellulaire et inflammation chronique

De la même façon que le contexte pathologique (Fah^{-/-}) dans le foie favorise la survenue d'évènements fusionnels, le nombre de fusions dans le cervelet peut être augmenté de manière très importante dans des conditions spécifiques d'inflammation chronique. Dans un modèle d'encéphalite autoimmune expérimentale, Johansson *et al.* ont rapporté une augmentation spectaculaire des évènements fusionnels d'environ trente fois

entre les cellules hématopoïétiques et les neurones de Purkinje en comparaison avec le groupe contrôle (Johansson *et al.* 2008). L'accroissement de la fusion des cellules de la MO en relation avec le microenvironnement inflammatoire a aussi été mis en évidence dans les cellules épithéliales intestinales (Davies *et al.* 2009). Dans cet exemple, non seulement la fusion a été démontré mais également la reprogrammation du génome des cellules de la MO qui ont exprimé un gène spécifique de l'intestin. Toujours dans le système digestif, les cellules de la MO ont été montrées comme fusionnant avec les cellules épithéliales de l'estomac dans un contexte d'inflammation chronique provoqué par la bactérie *Helicobacter pylori*, processus pouvant conduire à l'émergence de cancers gastriques (Houghton *et al.* 2004; Houghton et Wang 2005).

Les bénéfices potentiels de la fusion dans la thérapie cellulaire ne doivent pas masquer les risques possibles de ce processus associés à l'apparition de cancers. Même si à ce jour aucune donnée ne prouve qu'un évènement de fusion soit directement responsable de l'apparition d'un cancer, son implication dans la progression tumorale est bien documentée (Duelli et Lazebnik 2003; Duelli et Lazebnik 2007). La fusion peut conférer de nouvelles propriétés aux cellules déjà transformées comme le caractère métastatique qui est acquis après fusion de leucocytes circulants à des cellules tumorales (Pawelek 2008). Elle peut aussi augmenter le caractère malin de la tumeur, par exemple en améliorant sa résistance aux drogues (Miller *et al.* 1989). Enfin la fusion pourrait être à l'origine des cellules souches cancéreuses (Bjerkvig *et al.* 2005).

4. Objectifs et présentation de l'étude

Au regard de la littérature sur les capacités de fusion des cellules souches, nous avons émis l'hypothèse que ce mécanisme tient une part non négligeable dans les mécanismes de régénération tissulaire. Cependant, la nature même de ce phénomène le rend difficilement observable et quantifiable *in vivo*. En effet, l'étape ultime après la formation d'un synkarion est une réduction du nombre de chromosomes aboutissant à une normalisation de la ploïdie ce qui ne facilite pas la détection du produit de la fusion dans les tissus. C'est pourquoi nous avons développé une approche expérimentale consistant à réaliser une coculture *in vitro* entre les cellules hMADS et des cardiomyocytes murins adultes post-mitotiques (Figure 13). Cette étape de coculture permet d'augmenter l'incidence des évènements de fusion et nous fournit un support moins complexe qu'un organe pour l'étude de ce mécanisme.

Mon travail de thèse a consisté au sein de ces cocultures, à caractériser phénotypiquement les cellules hybrides issues de la fusion puis à analyser les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Dans une deuxième partie, nous avons cherché à identifier des facteurs susceptibles d'augmenter le potentiel de reprogrammation nucléaire médié par les cellules souches. Enfin la dernière partie de ma thèse a porté sur la possibilité de transposer la méthode de coculture et de reprogrammation à d'autres types cellulaires d'intérêt thérapeutique.

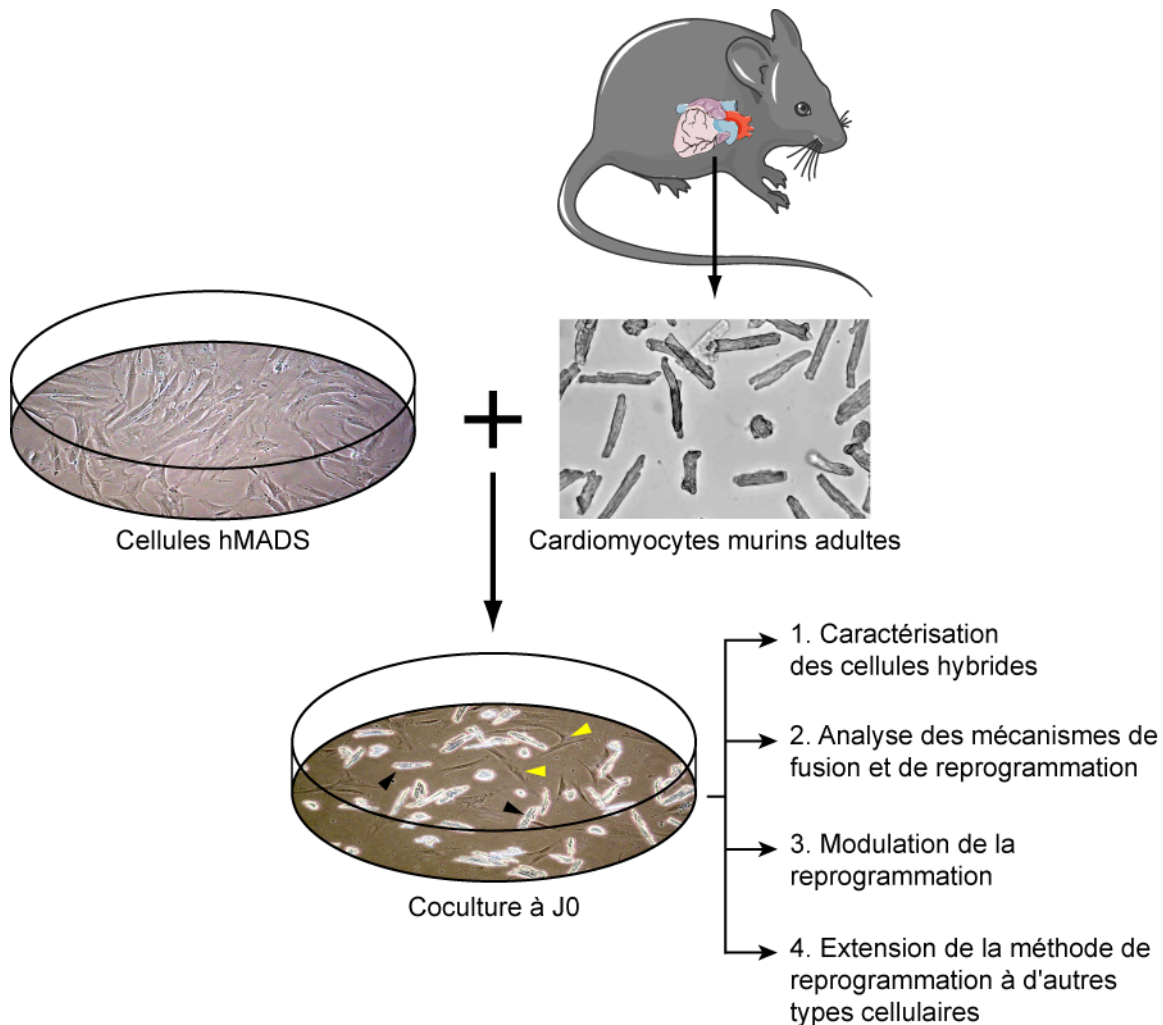


Figure 13. Présentation de l'approche expérimentale et des objectifs de l'étude. Schéma du principe de la coculture entre les cellules hMADS (têtes de flèches jaunes) et les cardiomyocytes murins adultes (têtes de flèches noires).

MATERIEL
et
METHODES

MATERIEL et METHODES

1. Isolement et culture cellulaire

Toutes les cellules ont été incubées à 37°C, en atmosphère humide et enrichie en CO₂ (5%) et cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) *low glucose* (1 g/L, Invitrogen) supplémenté en sérum de veau foetal (SVF, Dominique Dutscher, Brumath, France) 10% inactivé à la chaleur ; HEPES, 10 mM ; pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL (Gibco, Cergy Pontoise, France).

Cellules hMADS

Les cellules hMADS ont été isolées à partir du tissu adipeux blanc de jeunes donneurs sains avec le consentement éclairé des parents et l'approbation du Comité Ethique Régional (Comité de Protection des Personnes Ile de France IX). Les biopsies ont été recueillies lors d'une chirurgie réalisée dans la région ombilicale, pubienne ou inguinale des patients. L'isolement des cellules hMADS a été pratiqué selon un protocole précédemment publié (Rodriguez *et al.* 2005b). Brièvement, une quantité d'environ 200 mg de tissu a été digéré pendant 20 à 30 minutes à 37°C sous agitation dans une solution de DMEM additionné de 2 mg/mL de collagénase B (Roche Diagnostics, Meylan, France), de 20 mg/mL de séralbumine bovine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline and 100 g/mL de streptomycine, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La fraction stroma vasculaire a été séparée de la fraction adipocytaire par centrifugation (200 g ,10 min) et mise en culture en boîtes de Pétri (diamètre 100 mm ; Greiner bio-one, Les Ulis, France). Le milieu est remplacé après environ 12 heures pour éliminer la sous population CS à adhésion lente et enrichir la préparation en cellules de la fraction CA à adhésion rapide qui va donner les cellules hMADS. Ces cellules ont étéensemencées à une densité de 1000 à 3500 cellules / cm². Lorsqu'elles atteignent environ 70% de confluence, les cellules sont repiquées au ¼ (1000 - 2000 cellules / cm²) après dissociation (trypsine EDTA 0,25% ; Invitrogen) et centrifugation (300 g, température ambiante).

CSM humaines de moelle osseuse

Les cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) nous ont été gracieusement fournies par madame le docteur Hélène Rouard (Etablissement Français du Sang, Créteil, France). Les CSM ont été isolées selon le protocole publié précédemment (Chevallier *et al.*

2010) et après obtention du consentement éclairé des donneurs. Brièvement, les cellules sont issues d'aspirats de moelle de la crête iliaque de patients donneurs dans le cadre d'une transplantation de MO (Hôpital Henri Mondor, AP-HP Créteil, France). Les cellules nucléées de la moelle (dont environ 0,001% sont des CSM) ont été récupérées,ensemencées à $2 \cdot 10^5$ cellules/cm² et cultivées dans du milieu α -MEM (α -modified Eagle's medium, Invitrogen) supplémenté en SVF 10%, ceftriaxone 0,5% (Bayer Pharma, Puteaux, France) et glutamine 1%. Les cellules nous ont été fournies sous forme d'ampoule de cellules congelées au passage 1.

Fibroblastes humains MRC5

Cette lignée fibroblastique nous a été gracieusement fournie par monsieur le docteur Jorge Boczkowski (IMRB équipe 04, INSERM U955, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France). Il s'agit d'une lignée de fibroblastes embryonnaires de poumon humain sain capables de 42 à 46 doublements de population provenant de l'ATCC (Molsheim, France).

Obtention de la lignée de cellules hMADS déplétées en mitochondries (hMADS ρ 0)

La déplétion en mitochondries de la lignée hMADS ρ 0 a été réalisée par traitement au bromure d'éthidium (BET, Sigma-Aldrich) 0,5 μ g/mL dans du DMEM supplémenté en SVF. Pour assurer la survie des cellules sans mitochondries, 50 μ g/mL d'uridine (Sigma-Aldrich) et 100 μ g/mL de pyruvate (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés au DMEM additionné de BET. La durée du traitement a été d'au minimum 1 mois (King et Attardi 1989; Miller *et al.* 1996; Spees *et al.* 2006).

L'absence de mitochondries a été confirmée après marquage au MitoTracker Green et avec un anticorps spécifique des mitochondries humaines.

2. Lignées murines et isolement des cardiomyocytes et des neurones ganglionnaires

Les cardiomyocytes adultes ont été obtenus à partir de plusieurs lignées de souris âgées de 2 à 5 mois, incluant des C57BL/6J (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France), des souris transgéniques GCAG-GFP (données gracieusement par le docteur Fabrice Chrétien, Institut Pasteur, Paris, France) et des souris transgéniques ROSA26R (Okabe *et al.* 1997) (don gracieux du docteur Shaharagim Tajbakhsh, Institut Pasteur). Ces

animaux ont été stabulés dans une animalerie thermostatée à 22°C avec un degré d'hygrométrie ambiante de 55%. Ils ont eu un libre accès à la nourriture et à la boisson et ont été soumis à un rythme nycthéral imposé de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

Les cardiomyocytes néonataux et les neurones des ganglions rachidiens ont été obtenus à partir de souriceaux et de souris de la lignée C57BL/6J (Centre d'Élevage Janvier).

Toutes les manipulations ont été réalisées en conformité avec la législation relative à l'expérimentation animale.

Cardiomyocytes adultes

Le protocole d'isolement a été adapté de Mitra et Morad (Mitra et Morad 1985). La souris a été anesthésiée par voie intrapéritonéale avec un mélange de 250 mg/kg de kétamine (kétamine 1000 Virbac France, Carros, France) et 10 mg/kg de xylazine (Rompun 2%, Bayer Santé, Puteaux, France) additionné de 500 U.I. d'héparine (Héparine Choay 25000 U.I./5 mL ; Sanofi Winthrop, Gentilly, France). Après anesthésie, le rongeur a subi une laparotomie médiane suivie d'une thoracotomie. Le cœur a été excisé le plus haut possible et immédiatement plongé dans une solution de perfusion ([mM] NaCl 113 ; KCl 4,7 ; KH₂PO₄ 0,6 ; Na₂HPO₄ 0,6 ; HEPES 10 ; MgSO₄ 1,2 ; NaHCO₃ 12 ; KHCO₃ 10 ; taurine 30 ; rouge de phénol 0,032 ; glucose 5,5 ; pH ajusté à 7,46) refroidie sur un lit de glace. Tous les produits proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Le cœur excisé a été placé sur un appareil de type Langendorff par canulation de l'aorte pour être perfusé à pression et température (37°C) constantes par la solution de perfusion. Une fois l'organe rincé, la solution de perfusion a été remplacée par un tampon de digestion composé de solution de perfusion additionnée de CaCl₂ 12,5 μM (Sigma-Aldrich) et d'enzymes (libérase TM Research Grade 0,1 mg/mL, Roche Applied Science, Meylan, France ; trypsine 0,14 mg/mL, Sigma-Aldrich). Lorsqu'il a été bien digéré, le myocarde prend une consistance gélatineuse. Il a été alors détaché de l'appareil, les oreillettes ont été retirées et les ventricules ont été dilacérés à l'aide de ciseaux. La réaction de digestion a été immédiatement stoppée par ajout d'un tampon d'arrêt (Stopping Buffer 1) composé de solution de perfusion contenant du CaCl₂ 12,5 μM et du sérum de veau nouveau-né 10% (Gibco). La dissociation finale du myocarde a été assurée par trituration douce à la pipette Pasteur. L'homogénat a été filtré sur une toile en nylon de 300 μm de seuil (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les cellules vivantes sédimentent par gravité après quelques minutes. Le surnageant a été éliminé et les cardiomyocytes ont été resuspendus dans un tampon (Stopping Buffer 2) composé de solution de perfusion additionnée de CaCl₂ 12,5 μM et de sérum de veau nouveau-né 5%. S'en suit une étape d'enrichissement en calcium qui a consisté à répéter l'opération suivante : aspiration du

surnageant après sédimentation des cellules et ajout de Stopping Buffer 2 contenant des concentrations croissantes en calcium, à savoir, [μM] 62 ; 112 ; 212 ; 500 ; 1000.

Cardiomyocytes néonataux

Des souriceaux âgés de moins de 48 heures ont été euthanasiés par décapitation et les cœurs ont été prélevés après thoracotomie puis coupés en deux et rincés dans une solution froide de *Hank's balanced salt solution* (HBSS, Gibco) pour éliminer un maximum de globules rouges. Les cœurs ont ensuite été digérés pendant 5 heures à 4°C sous agitation dans une solution de HBSS contenant 0,25% de trypsine et 1 mM d'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) (Gibco). La digestion enzymatique a été stoppée par addition de DMEM supplémenté en SVF (10%) et antibiotiques et préalablement chauffé à 37°C. Parallèlement, une solution de HBSS froid additionné de 0,1% de collagénase de type II (240 U/mg, Gibco) a été préparée, filtrée et répartie dans 5 tubes. Le surnageant du tube contenant les cœurs digérés par la trypsine a été éliminé et remplacé par le premier aliquot de collagénase 0,1%. La digestion par la collagénase a été effectuée à 37°C sous agitation et après 2 à 3 minutes, le milieu d'une apparence trouble du fait de la présence de cellules est collecté et mis de côté. Cette opération de digestion et de collecte a été répétée avec les 4 aliquots suivant de collagénase. Ce milieu renfermant les cellules a été centrifugé à 300 g pendant 5 minutes puis le culot a été resuspendu dans du DMEM supplémenté en SVF et antibiotiques. En parallèle, un gradient isotonique de percoll à 39% contenant 120 mM de NaCl a été préparé. Les cellules ont été déposées précautionneusement sur ce gradient puis le milieu a été centrifugé à 750 g pendant 30 minutes sans frein. Le culot contenant les cardiomyocytes a été rincé deux fois puis ensemencé en boîtes de culture. Après 20 minutes, les cellules flottantes ont été récupérées et mises en coculture alors que les cellules qui ont adhérées (majoritairement des fibroblastes) ont été éliminées.

Neurones de ganglions rachidiens

Le protocole a été adapté de Delree *et al.* (Delree *et al.* 1989). La souris a été anesthésiée par voie intrapéritonéale avec un mélange de 250 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine puis décapitée. La colonne vertébrale a été disséquée et placée dans une boîte de Pétri contenant du PBS puis découpée selon le plan sagittal. La moelle épinière a été retirée des deux demi-colonnes et les ganglions ont été prélevés et séparés de leurs racines. Les ganglions ont été digérés par une solution de collagénase D 0,5% (Roche Applied Science) pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. La collagénase a été remplacée par une solution de trypsine 0,5% à 37°C sous agitation. La digestion

enzymatique de 15 minutes a été stoppée par addition de DMEM supplémenté et centrifugation à 300 g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans du DMEM supplémenté et la dissociation des ganglions par trituration mécanique a été réalisée par aspirations successives dans des pipettes Pasteur rodées de diamètre d'ouverture décroissant. Le matériel cellulaire non digéré a sédimenté et le surnageant a été récolté et mis en culture.

3. Coculture avec les cardiomyocytes et les neurones ganglionnaires

Les cardiomyocytes (adultes et néonataux) et les neurones des ganglions rachidiens fraîchement isolés ont été mis en coculture, en fonction des expériences, avec les cellules hMADS, les CSM ou les fibroblastes MRC5 dans du DMEM supplémenté additionné de fungizone (2,5 µg/mL) et de gentamicine (100 µg/mL ; Gibco). Le milieu a été remplacé après 48 heures par du milieu supplémenté classique décrit plus haut. Les deux types cellulaires cocultivés ont été comptés sur une cellule de Malassez avant mise en culture suivant un ratio 1:1. Les expériences de qRT-PCR ont été réalisées à partir de puits de boîtes 6 puits avec 1.10^5 cellules par puits. L'inhibition de contact physique a également été réalisée en boîtes 6 puits en présence d'inserts de culture constitués d'une membrane de polycarbonate dont les pores mesurent 0,4 µm et laissent passer uniquement les facteurs solubles (Millicell, Millipore). Des inserts identiques mais ayant des pores de 8 µm laissant passer les organites, les corps apoptotiques et les débris cellulaires ont été utilisés pour l'étude du transfert de matériel entre cardiomyocytes et cellules souches. Pour l'immunocytochimie, de 2 à 3.10^5 cellules ont été distribuées par boîte de culture de diamètre 60 mm (Greiner bio-one). En vue des observations en microscopie confocale, la coculture a été réalisée dans des boîtes de culture de type Labtek permanox (VWR, Fontenay-sous-bois, France). Le nombre de cellules a été d'environ $2,5$ à 4.10^4 .

4. Détection de la fusion cellulaire entre cellules hMADS et cardiomyocytes

Système Cre/LoxP

Les cellules hMADS ont été transduites par un adénovirus de sérotype V exprimant la recombinaise Cre sous la dépendance d'un promoteur du cytomegalovirus (don gracieux du docteur Athanassia Sotiropoulos, Institut Cochin, Paris, France) 48 à 72 heures avant la coculture avec les cardiomyocytes ROSA26R. L'ADN de ces souris ROSA26R porte le locus LacZ, qui code pour la β-Galactosidase (β-Gal), sous le contrôle d'un codon stop flanqué de

deux sites loxP (Soriano 1999). Si les cellules hMADS exprimant la Cre fusionnent avec les cardiomyocytes ROSA26R, la recombinaise va reconnaître et exciser les sites loxP contenant le codon stop ce qui va entraîner l'expression de la β -Gal dans les cellules fusionnées (Figure 14). En conséquence, les cellules fusionnées et leur progénie pourront être détectées par une coloration au X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), le substrat de la β -Gal ou bien par immunocytochimie avec un anticorps dirigé contre la β -Gal.

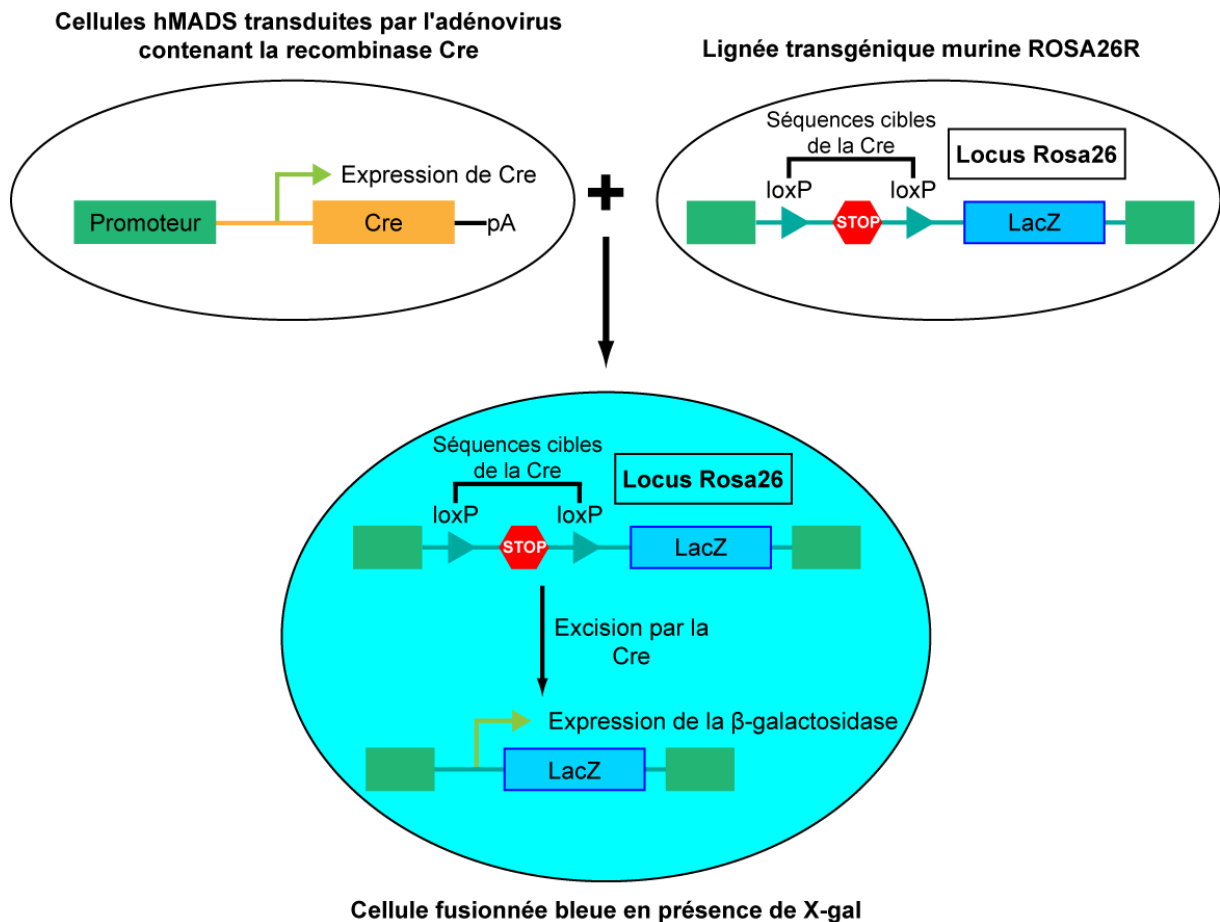


Figure 14. Principe de la détection de cellules hybrides issues d'une fusion par le système Cre-LoxP et marquage au X-Gal. Si il y a fusion entre les cellules hMADS exprimant la recombinaise Cre et les cardiomyocytes murins de la lignée ROSA26R, la Cre va exciser les séquences spécifiques LoxP dans l'ADN des cardiomyocytes ROSA26R. L'excision des sites LoxP flanquant un codon stop permet la transcription du locus LacZ qui aboutit à l'expression de la β -Gal dans les cellules hybrides. En présence de X-Gal, les cellules hybrides β -Gal⁺ se colorent en bleu. D'après (Alvarez-Dolado *et al.* 2003).

Marquage au X-Gal

Les cellules en coculture ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA) 2% avant d'être placées dans un tampon phosphate contenant 10 mM de ferricyanure de potassium (Sigma-Aldrich),

10 mM de ferrocyanure de potassium (Sigma-Aldrich) et 1 mg/mL de X-Gal (Qiagen, Courtaboeuf, France) à 37°C pendant 24 heures. Les cellules ont été rincées au *phosphate buffer saline* (PBS, Gibco) 1X puis observées au microscope dans un milieu de montage contenant 70% de glycérol.

5. Marquages des échanges intercellulaires et du transfert de mitochondries

Avant la coculture et en fonction des expérimentations, les différents types cellulaires (cardiomyocytes et cellules hMADS) ont subi plusieurs marquages. Les échanges de matériel cytoplasmique ont été visualisés par un marquage des cardiomyocytes adultes et des neurones rachidiens avec du CM-Dil (5 μ M) et un marquage des cellules souches avec du Qtracker 525 (4 nM). Le matériel nucléaire murin des cardiomyocytes a été marqué avec du Syto 64 (500 nM) et l'ADN humain avec du Syto 11 (200 nM). Enfin le transfert de mitochondries a pu être mis en évidence par un marquage de ces organites avec du MitoTracker Red (1 μ M) pour les cardiomyocytes alors que les mitochondries des cellules hMADS ont été marquées avec du MitoTracker Green FM (200 nM). Tous ces marqueurs fluorescents proviennent du fournisseur Molecular Probes (Cergy Pontoise, France) et les marquages ont été réalisés en accord avec les instructions du fabricant. Lorsque les cellules ont été fixées (PFA 4%, 5 min), une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 (R&D, MN, Etats-Unis) a été pratiquée avant montage dans un milieu hydrophile (Vectashield, Vector, CA, Etats-Unis). La quantification des échanges entre les cellules a été réalisé par cytométrie en flux (Cyan ADP associé au logiciel Summit v4.3, Beckman Coulter, Villepinte, France ; plate-forme de cytométrie en flux, IMRB).

6. Estimation du taux de prolifération des progéniteurs murins par comptage cellulaire au MTT

Pour estimer le taux de prolifération des cellules murines dans la coculture, il a fallu éliminer les cellules humaines une fois la reprogrammation des cardiomyocytes vers un stade de progéniteur effectuée. L'élimination des cellules humaines au sein des cocultures a débuté après 72 heures de coculture entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins par traitement avec de l'ouabaine 10 μ M (Zhang *et al.* 2007). Le traitement a été renouvelé tous les jours pendant 5 jours. L'absence des cellules hMADS après traitement à l'ouabaine a été confirmée par immunomarquage avec l'anticorps anti lamine A/C humaine. Entre le huitième et le quatorzième jour de la coculture, l'accroissement du nombre de cellules murines correspondant aux progéniteurs a été

estimé chaque jour. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du DMEM supplémenté contenant 0,1 mg/mL de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Après l'incubation, les cellules ont été délicatement rincées puis lysées par du diméthylsulfoxyde (DMSO). Le lysat est lu dans les 30 minutes au spectrophotomètre à 520 nm contre un blanc (DMSO pur). Des cellules hMADS seules traitées à l'ouabaine et une coculture non traitée à l'ouabaine ont servies de contrôles à l'expérience.

7. Cellules hMADS et implication du statut du cycle cellulaire dans la reprogrammation des cardiomyocytes

Avant la coculture, la croissance des cellules souches a été inhibée par une irradiation gamma à 100 grays. La synchronisation en phase G1/M ou G2/M avant contact avec les cardiomyocytes a été effectuée respectivement par traitement à l'aphidicoline 500 ng/mL (Sigma-Aldrich) pendant 24 heures ou au nocodazole 1 µg/mL (Sigma-Aldrich) pendant 48 heures. La confirmation des effets sur le cycle cellulaire de ces traitements a été vérifiée, 24 heures après l'irradiation ou juste après avoir retiré les drogues, par prétraitement à la ribonucléase A (250 µg/mL, Invitrogen), marquage à l'iodure de propidium (50 µg/mL, Sigma-Aldrich) et analyse par cytométrie en flux (plate-forme de cytométrie en flux, IMRB).

8. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qRT-PCR)

Les ARN totaux de la coculture ou des cellules hMADS seules ont été extraits à jour 0, 1, 2, 4 et 7 à l'aide du RNeasy Mini kit (Qiagen), puis rétro-transcrits en ADN complémentaire avec les kits Superscript First-Strand Synthesis System et Oligo(dT)20 (Invitrogen). Les réactions de qRT-PCR ont été répétées trois fois sur un appareil de type 7900 qRT-PCR detection system associé au logiciel d'acquisition et d'analyse SDS 2.3 (Applied Biosystems, Cergy Pontoise, France) en utilisant le Super Mix Platinum SYBR Green pour qRT-PCR (Invitrogen). Les conditions de PCR ont été les suivantes : 2 minutes à 50°C suivies de 2 minutes à 95°C puis 45 cycles comprenant une étape à 95°C pendant 15 secondes et une étape à 60°C pendant 45 secondes et enfin la terminaison de la réaction par 15 secondes à 60°C et 15 secondes à 95°C. Le gène de référence choisi a été celui de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les séquences des amorces spécifiques d'espèces (humaine et murine) utilisées sont regroupées dans le Tableau 4. Les résultats ont été exprimés par des valeurs de moyennes ± écarts types. Pour

les comparaisons entre groupes, le test t de Student a été utilisé. Des valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Gène h : humain m : murin	Amorce sens (F) Amorce antisens (R)	Température d'hybridation (°C)
h Desmine	F : CAAGACCATCGAGACACG R : GCAGGGATGGGCTATGTC	60
h GAPDH	F : GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC R : ACTCCGACCTTCACCTTCC	60
h GATA-4	F : TCCCAGACGTTCTCAGTC R : GAGACGCATAGCCTTGTG	60
h Ki67	F : ACGTCGTGTCTCAAGATC R : CGGTACTGTCTTCTTTGAC	60
h MEF-2C	F : GTTTAACACCGCCAGCG R : GAGTGCTAGTGCAAGCT	60
h P300	F : TCTGTTCCACCCCAACA R : GTCTTCCACTTTAGACTCTGAA	60
m cTnT	F : GAGCAAGAGGAGGCAGTGGA R : GGCTTCTTCATCAGGACCAACC	60
m Desmine	F : AAGGGGTTCTGAAGTCCATAC R : ACCACAAAGGGGTGATCG	60
m GAPDH	F : AAGAGAGGCCCTATCCCAAC R : GCAGCGAACTTTATTGATGG	60
m GATA-4	F : GAGGCCCGCAGAGTG R : CCCAGACGCAGTCCAG	60
m Ki67	F : CCTTTGGTGGACATCTAAGACC R : TGTCTCGGTGGCGTTATC	60
m MEF-2C	F : TTCAACACTGCCAGTGCG R : GAAGGCAGGGAGAGATTTGAAC	60
m P300	F : AAATGCTGGGGATAAGCGAAA R : TCCAGATGGCTGGCTTTGT	60

Tableau 4. Liste des amorces utilisées en qRT-PCR.

9. Inhibition de la polymérisation des microtubules et de la f-actine

Après mise en coculture et adhésion (environ 6 heures), les cellules ont été traitées pendant 12 h avec 1 μM de nocodazole (Sigma-Aldrich) pour inhiber la polymérisation de l' α -tubuline (protéine constituante des microtubules) ou avec 0,5 μM de cytochalasine D ou 0,25 μM de latrunculine A (Sigma-Aldrich), deux inhibiteurs de polymérisation de la f-actine. Le traitement a été renouvelé deux fois, tous les 3 jours.

10. Evaluation du taux de reprogrammation des cardiomyocytes adultes

Pour déterminer le taux de reprogrammation des cardiomyocytes, les cocultures entre des cellules hMADS-Cre⁺ et des cardiomyocytes ROSA26R ont été traitées par 10µg/mL de mitomycine C (Sigma-Aldrich). Dans ces conditions où la prolifération de toutes les cellules de la coculture (dont les cellules hybrides issues de la reprogrammation nucléaire des cardiomyocytes) a été inhibée, le comptage des cellules hybrides β-Gal⁺ / GATA-4⁺ reflète directement et uniquement du nombre de cardiomyocytes reprogrammés après fusion avec les cellules hMADS. Le calcul du taux de reprogrammation a été effectué en ramenant le nombre de cellules doubles positives au nombre de cardiomyocytes vivants au moment de l'isolement, mesuré par cytométrie en flux, car seuls cette catégorie de cardiomyocytes est susceptible d'être reprogrammée.

11. Immunocytochimie

Les cellules ont été fixées selon l'anticorps utilisé et en accord avec les instructions des fournisseurs, soit au PFA 4% pendant 5 min soit par un mélange méthanol/acétone 50/50 à -20°C durant 3 minutes. Dans tous les cas, après réhydratation, la saturation des sites protéiques non spécifiques a été assurée par une incubation d'une heure à température ambiante dans une solution de PBS, Triton X-100 0,5%, sérum d'âne 10% (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été ensuite incubées toute la nuit à 4°C en atmosphère humide en présence de l'anticorps primaire (Tableau 5 pour les spécificités, les origines et les dilutions). Ce dernier a été révélé par un anticorps secondaire anti-espèce dilué au centième réalisé chez l'âne et couplé à un fluorochrome (Cyanine 3 (Cy-3), Cyanine 5 (Cy-5) ou isothiocyanate de fluorescéine (FITC), Jackson Immunoresearch Laboratories, Suffolk, Royaume-Uni). Une contre coloration systématique des noyaux a été réalisée à l'aide de Hoechst 33342 avant montage en milieu hydrophile et observation au microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan 2 Imaging).

Le comarquage α-tubuline / phalloïdine-*Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate* (TRITC, Sigma-Aldrich) a été réalisé après fixation au PFA 4% pendant 5 minutes puis par un passage rapide dans l'acétone à -20°C. Le marquage complet avec l'anticorps primaire anti α-tubuline et son secondaire associé a été accompli puis l'incubation en phalloïdine-TRITC à 5 µg/mL, d'une durée de 40 minutes, a été réalisée à 37°C et suivie d'une contre coloration au Hoechst 33342.

Anticorps Anti-	Type / Espèce	Spécificité	Dilution	Fournisseur
α -actinine sarcomérique	Monoclonal / souris	Humain / murin	1:500	Sigma Aldrich
α -SMA	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:100	Abcam
α -Tubuline	Monoclonal / souris	Humain / murin	1:100	Abcam
β -galactosidase	Polyclonal / poulet		1:500	Abcam
Desmine	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:100	Abcam
GATA-4	Polyclonal / chèvre	Humain / murin	1:20	R&D Systems
GATA-4	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:50	Santa Cruz
GFP	Polyclonal / lapin		1:100	Gene Tex
Ki67	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:500	Abcam
Lamine A/C	Monoclonal / souris	Humain	1:100	Novocastra
Lamine A/C	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:100	Cell Signaling
MEF-2C	Polyclonal / chèvre	Humain / murin	1:50	Santa Cruz
Mitochondries humaines	Monoclonal / souris	Humain	1:800	Abcam
Nkx 2.5	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:50	Santa Cruz
P4HB	Monoclonal / souris	Humain / murin	1:100	Novus Biologicals
Troponine cardiaque I	Polyclonal / lapin	Humain / murin	1:100	Abcam
β III-Tubuline	Monoclonal / souris	Humain / murin	1:200	R&D Systems

Tableau 5. Liste des anticorps utilisés. SMA : *smooth muscle actin* ; GFP : *green fluorescent protein* ; MEF-2C : *myocyte enhancer factor-2C* ; P4HB : *prolyl four hydroxylase subunit beta*.

12. Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les cocultures

Les expériences de FISH ont été effectuées comme décrit précédemment (Brown *et al.* 1999). Les sondes COT-1 (Roche diagnostics et Invitrogen) ont été marquées par *Nick translation* (Roche diagnostics) à la Cy-3 ou à la biotine. La sonde biotinylée a été révélée par de la streptavidine conjuguée à la fluorescéine (Sigma-Aldrich).

Pour les marquages centromériques consécutifs à une immunocytochimie, les cellules en coculture ont d'abord été marquées par l'anticorps anti-GATA-4 puis par les sondes centromériques spécifiques d'espèce couplées à la FITC (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Pays Bas). Après l'hybridation, les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 et observés en microscopie confocale (Zeiss LSM 510 Meta).

13. Acquisition des images

Microscopie optique

L'ensemble des images de microscopie optique ont été acquises à partir de quatre dispositifs différents. Les images de fusion après coloration au X-Gal ont été réalisées sur un microscope inversé Eclipse TS 100 (Nikon, Champigny sur Marne, France) en association avec un appareil photo numérique Coolpix P5000 (Nikon). Les images contenant des cellules observées à la fois en contraste de phase et en fluorescence ont été obtenues sur un microscope DMI6000 (Leica, Wetzlar, Allemagne) permettant la microscopie en temps réel (Plate-forme de recherche "ImagoSeine", Institut Jacques Monod, INSERM, Université

Paris Diderot-Paris, Paris, France;) associé au logiciel d'acquisition Metamorph 7 (Universal Imaging). Les images des cellules étudiées uniquement en fluorescence ont été obtenues soit sur un microscope à fluorescence Zeiss Axioplan 2 Imaging combiné au logiciel Zeiss Axiovision LE 4.6, soit sur un microscope confocal Zeiss LSM 510 Méta (Le Pecq, France) associé au logiciel du même nom (plate-forme d'imagerie tissulaire et cellulaire, IMRB, INSERM U955, Université Paris-Est Créteil, Créteil, France).

Microscopie électronique

Les cellules issues de la coculture ont été fixées une nuit dans une solution tampon de phosphate de sodium 0,1 M contenant 3% de glutaraldéhyde et à pH 7,4 puis post-fixées pendant 1h30 dans une solution de tétraoxyde d'osmium, déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100%) et incluses en résine époxy. Après polymérisation, des sections de 70 à 80 nm ont été préparées sur un ultramicrotome (Reichert Ultracut E, Depew, NY), marquées par une solution comprenant de l'acétate d'uranyle 2% et du citrate de plomb selon Reynolds et visualisées sur un microscope électronique à transmission Philips CM120 (plate-forme de microscopie électronique, IMRB).

RESULTATS

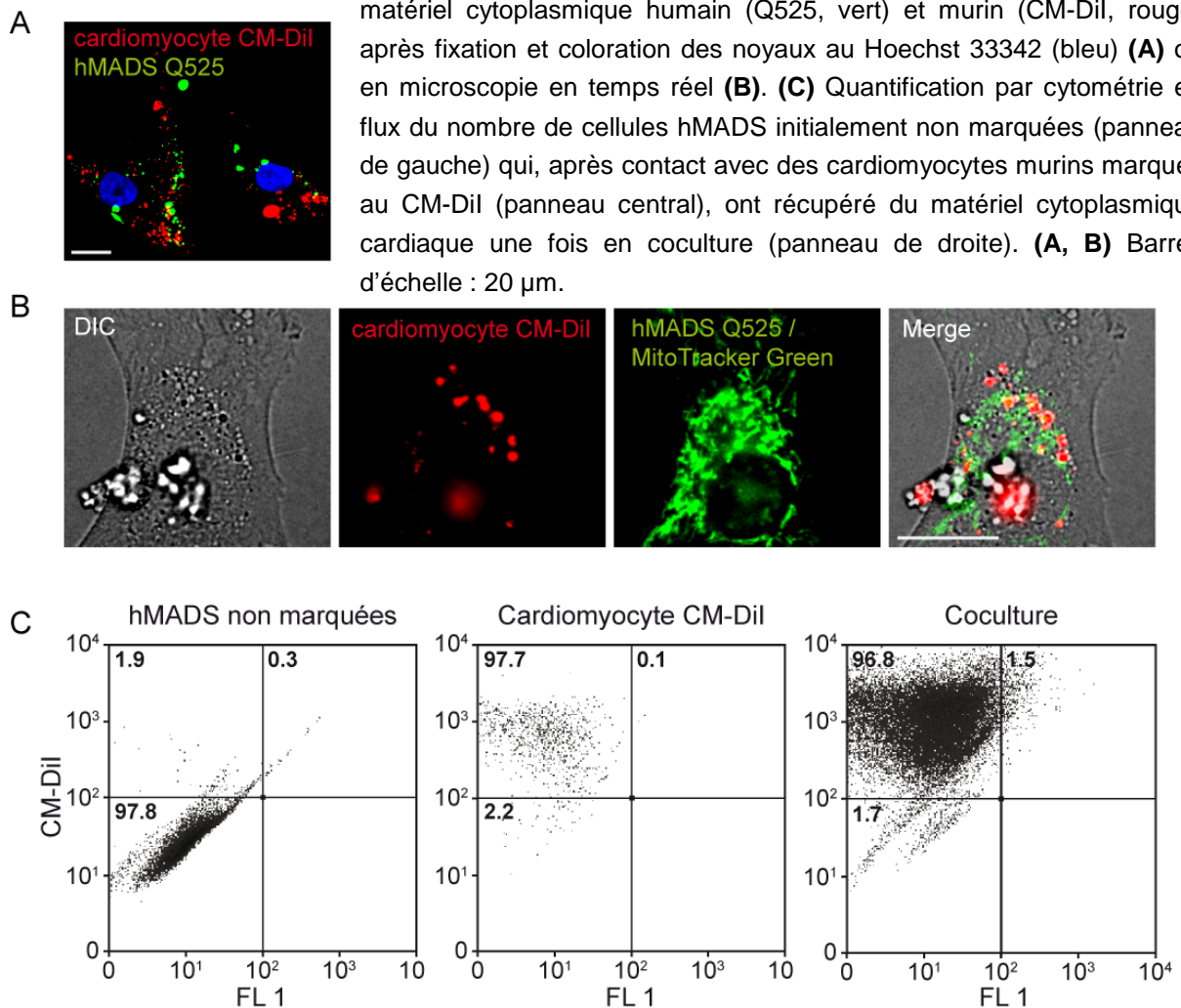
RESULTATS

1. Impact de la coculture sur les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes

1.1. Echanges de matériel cellulaire et formation de cellules hybrides

Préalablement à la coculture, les cytoplasmes des cellules hMADS et des cardiomyocytes ont été marqués respectivement avec les traceurs fluorescents vitaux QTracker 525 et CM-Dil. Dès 6 heures après mise en coculture, plus de 95% des cellules hMADS ont été identifiées comme contenant des macromolécules d'origine murine par analyse en fluorescence après fixation, par microscopie en temps réel et par cytométrie en flux, (Figure 15).

Figure 15. Echanges de matériel cytoplasmique entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes entre 6 et 24 heures après l'initiation de la coculture. (A, B) Cellules hMADS contenant du matériel cytoplasmique humain (Q525, vert) et murin (CM-Dil, rouge) après fixation et coloration des noyaux au Hoechst 33342 (bleu) (A) ou en microscopie en temps réel (B). (C) Quantification par cytométrie en flux du nombre de cellules hMADS initialement non marquées (panneau de gauche) qui, après contact avec des cardiomyocytes murins marqués au CM-Dil (panneau central), ont récupéré du matériel cytoplasmique cardiaque une fois en coculture (panneau de droite). (A, B) Barres d'échelle : 20 μ m.



De plus, en marquant le cytosquelette humain à la phalloïdine et l'ADN murin au Syto 11 ou bien par un marquage des noyaux humains et murins respectivement par du Syto 11 et du Syto 64 nous avons pu visualiser et quantifier que la totalité des cellules humaines ont hébergé au sein de leur cytoplasme du matériel nucléaire murin (Figure 16). Ces transferts de matériel nucléaire ont été observés jusqu'à 48 heures après le début de la coculture.

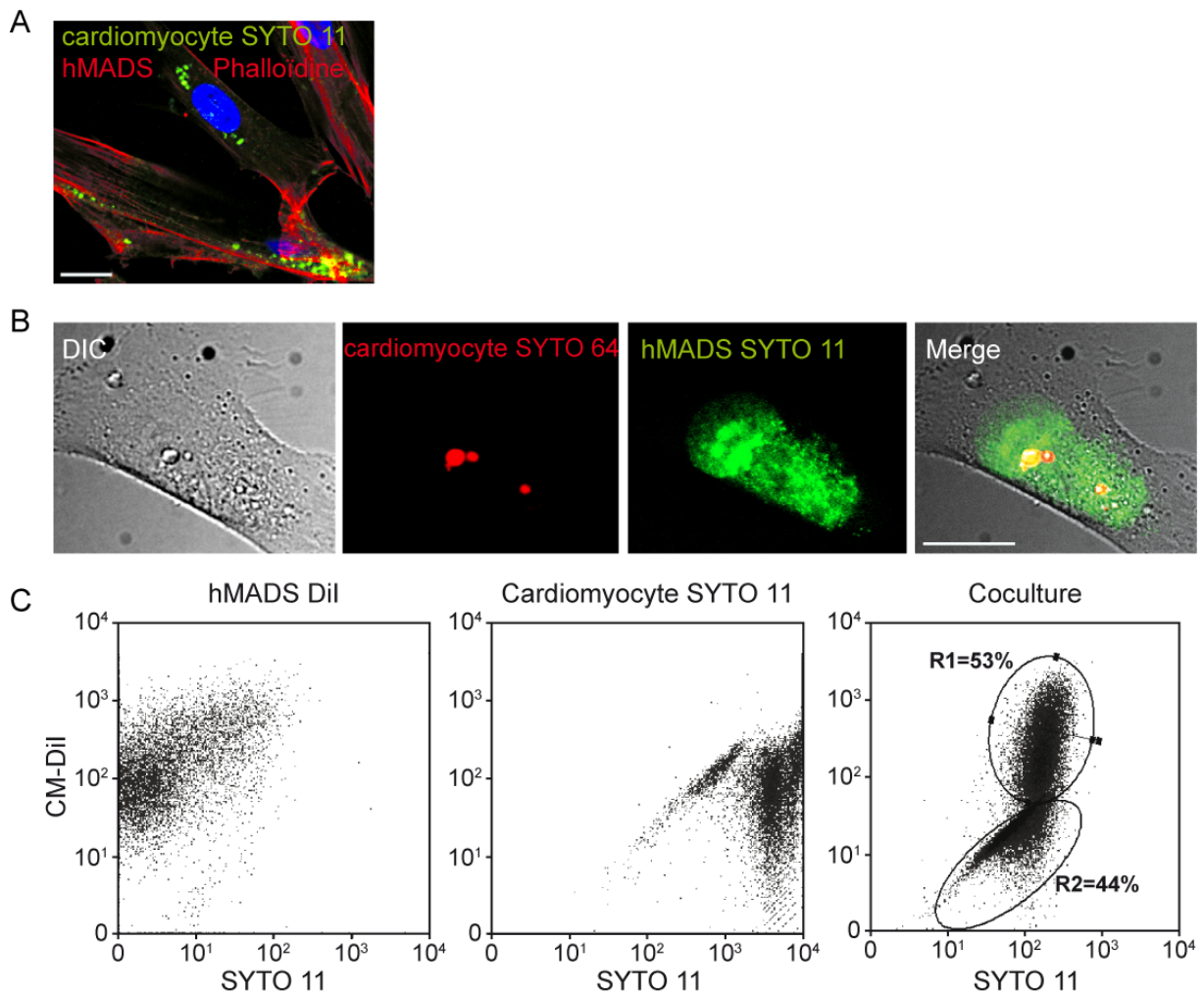


Figure 16. Echanges de matériel nucléaire entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes entre 6 et 24 heures après l'initiation de la coculture. (A) Détection de cellules hMADS contenant du matériel nucléaire murin (SYTO11, vert) après fixation et coloration des cytoplasmes à la phalloïdine-TRITC (rouge) et des noyaux au Hoechst 33342 (bleu). **(B)** Microscopie en temps réel d'une cellule hMADS dont le noyau est marqué au SYTO11 (vert) contenant du matériel nucléaire murin (SYTO64, rouge). **(C)** Quantification par cytométrie en flux du nombre de cellules hMADS initialement marquées au CM-Dil (panneau de gauche) qui, après contact avec des cardiomyocytes murins marqués au SYTO11 (panneau central), ont récupéré du matériel nucléaire cardiaque une fois en coculture (panneau de droite). **(A, B)** Barres d'échelle : 20 μ m.

Pour compléter l'étude de ces échanges, nous avons analysé le transfert d'organites entre ces deux types cellulaires. Nous avons choisi d'étudier le transfert de mitochondries parce qu'il a été décrit dans la littérature que les cellules souches mésenchymateuses sont capables de transférer leurs mitochondries à des cellules dont les organites ont été déplétés ou endommagés et qu'un tel transfert permettait ainsi à ces cellules une restauration de la respiration aérobie (Spees *et al.* 2006). De plus, une autre publication a montré qu'il existe un transfert intercellulaire de mitochondries entre des cardiomyocytes et des CSM en coculture (Plotnikov *et al.* 2008). Après marquage au Mitotracker Green FM et Mitotracker Red, respectivement des mitochondries humaines et murines, nous avons mis en évidence un transfert bidirectionnel d'organites entre les deux types cellulaires (Figure 17A, B). Nous avons montré qu'environ 8 cellules hMADS sur 10 sont capables de récupérer des mitochondries d'origine cardiaque (Figure 17C) et de manière réciproque, certains cardiomyocytes ont été détectés comme renfermant des mitochondries humaines (Figure 17B). L'ensemble de ces observations nous a permis de conclure à l'apparition de cellules hybrides en terme de matériel cytoplasmique, nucléaire et d'organites, quelques heures seulement après l'initiation de la coculture entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes. Néanmoins, au vu de nos observations, les cellules hybrides restent uninucléées et ne sont donc pas des hétérokaryons se formant après des événements cellulaires de fusion permanente comme précédemment suggéré dans la littérature (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Johansson *et al.* 2008; Weimann *et al.* 2003b).

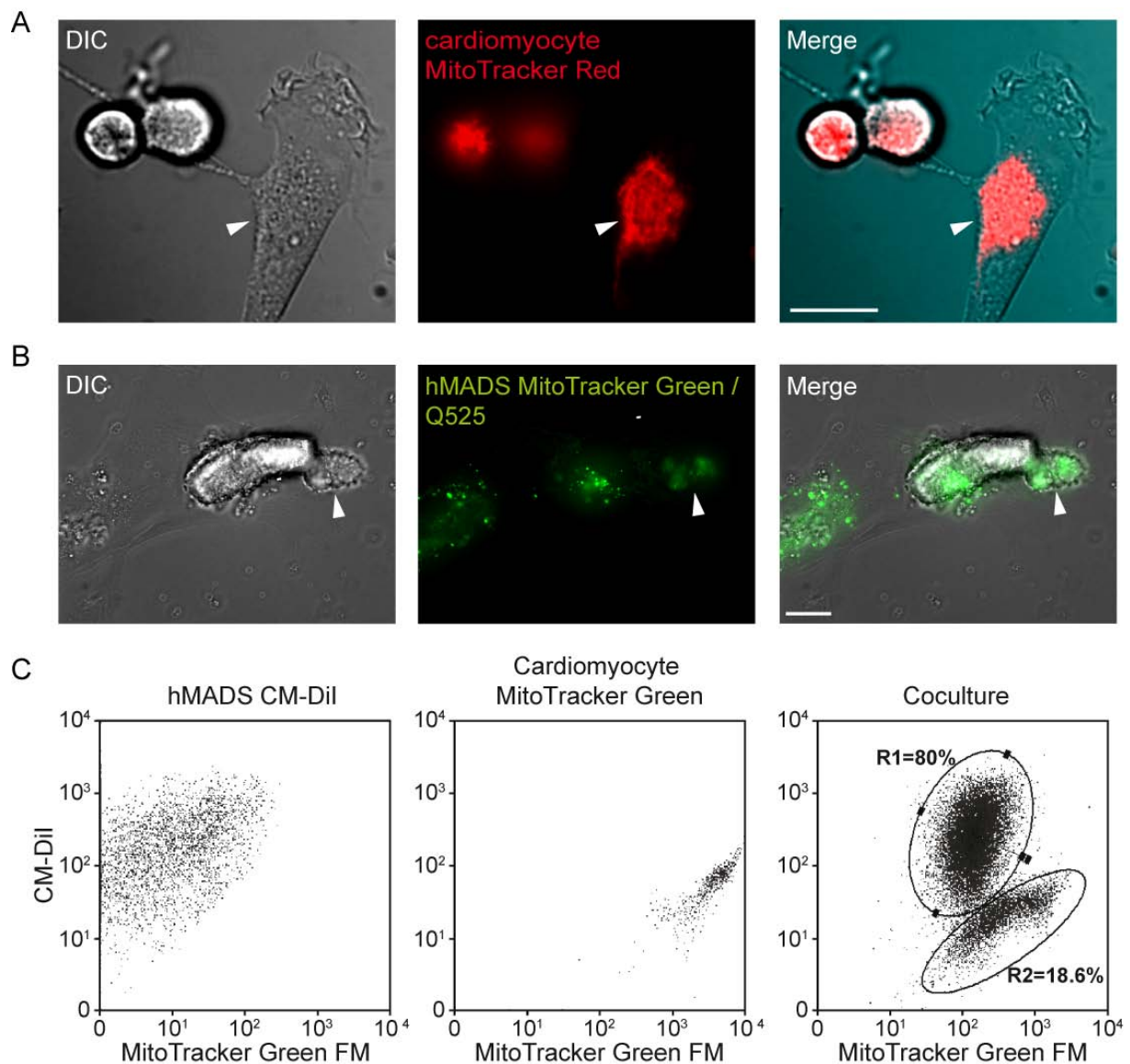


Figure 17. Echanges bidirectionnels de mitochondries entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes entre 6 et 24 heures après l'initiation de la coculture. (A) Microscopie en temps réel d'une cellule hMADS (tête de flèche) contenant des mitochondries murines (MitoTracker Red, rouge). **(B)** Microscopie en temps réel d'un cardiomyocyte (tête de flèche) contenant des mitochondries humaines (MitoTracker Green, vert) issues d'une cellule hMADS (MitoTracker Green / Q525, vert). **(C)** Quantification par cytométrie en flux du nombre de cellules hMADS initialement marquées au CM-Dil (panneau de gauche) qui, après contact avec des cardiomyocytes murins marqués au MitoTracker Green (panneau central), ont récupéré des mitochondries cardiaques une fois en coculture (panneau de droite). **(A, B)** Barres d'échelle : 20 μ m.

Afin de clarifier la nature de ces échanges (transferts intercellulaires ou phagocytose/endocytose), nous avons décidé de reproduire ces cocultures en présence d'un insert de culture qui consiste en une membrane semi-perméable qui permet la diffusion de vésicules, d'organites ou de corps apoptotiques dont la taille est inférieure à

8 μm mais inhibe le contact entre les cellules. Dans ces conditions, les cellules hMADS ont été incapables de capturer du matériel cytoplasmique ou nucléaire provenant du cardiomyocyte. Ce résultat suggère que le transfert de matériel a été effectué par l'intermédiaire de structures spécialisées permettant un transfert intercellulaire après contact et qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de phagocytose ou d'endocytose de corps apoptotiques présents dans le milieu de culture.

1.2. Formation et caractéristiques des cellules hybrides issues de la coculture

Quarante huit heures après l'initiation de la coculture entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins, des colonies de petites cellules rondes ont été détectées ayant une morphologie différente des deux types cellulaires en présence (Figure 18A). Nous avons voulu déterminer si ces cellules étaient bien des cellules hybrides issues de la fusion entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes. Pour ce faire, nous avons utilisé le système Cre/LoxP qui permet l'expression d'une enzyme, la β -Galactosidase (β -Gal), uniquement dans les cellules fusionnées (Figure 14). Une coculture entre des cellules hMADS, transduites au préalable par la recombinaise Cre, et des cardiomyocytes de la lignée murine ROSA26R a été réalisée. L'ADN de ces souris ROSA26R porte le locus LacZ, codant pour le gène de la β -Gal inséré entre deux sites loxP (Soriano 1999). Si les cellules hMADS exprimant la Cre fusionnent avec les cardiomyocytes ROSA26R, la recombinaise va reconnaître et exciser les sites loxP contenant le codon stop ce qui va entraîner l'expression de la β -Gal dans les cellules fusionnées. Après 2 jours de coculture, les petites cellules rondes identiques à celles détectées lors d'une coculture classique ont pu être identifiées comme exprimant la β -Gal après coloration en bleu en présence du substrat de l'enzyme, le X-Gal (Figure 18B). Le marquage au X-Gal a été réalisé également dans une coculture entre des cellules hMADS non transduites par l'adénovirus contenant la Cre et des cardiomyocytes ROSA26R afin d'écarter la possibilité d'une expression endogène de la β -Gal de la part des cellules hMADS (Figure 18C).

De plus ce résultat sur la fusion et l'expression de la β -Gal a été confirmé en immunocytochimie (ICC) par la co-expression de la β -Gal associée au marqueur cardiomyogénique précoce, GATA-4 (Figure 18D). L'expression de GATA-4, qui est un facteur de transcription spécifique de la voie myocardique, suggère que ces cellules hybrides appartiennent au lignage cardiaque. Une fois de plus la présence de β -Gal non spécifique a été vérifiée et exclue à l'aide d'un marquage sur une coculture entre des

cellules hMADS non transduites par la Cre cocultivées avec des cardiomyocytes ROSA26R et qui a révélé l'absence de l'enzyme au sein des cellules GATA-4 positives (Figure 18E).

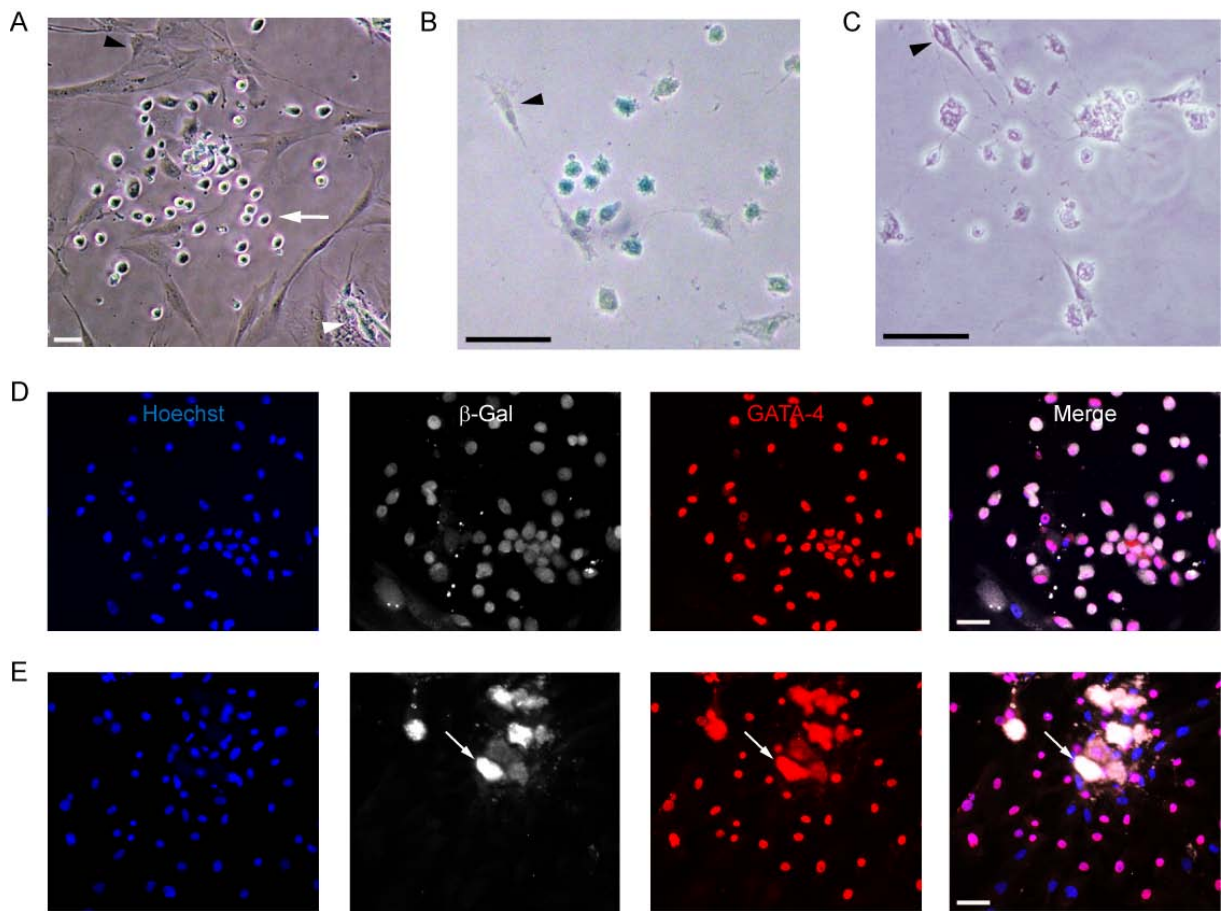


Figure 18. Détection des cellules hybrides au sein de la coculture après fusion. (A) Colonie de petites cellules rondes (flèche) avoisinant des cellules hMADS (tête de flèche noire) et des débris de cardiomyocytes (tête de flèche blanche) apparaissant après 48 heures de coculture. **(B)** Détection de cellules hybrides par marquage au X-Gal après 48 heures de coculture entre des cellules hMADS Cre⁺ (tête de flèche noire) et des cardiomyocytes ROSA26R. **(C)** Contrôle négatif du marquage au X-Gal réalisé avec des cellules hMADS non transduites (tête de flèche noire). **(D,E)** Co-immunomarquage de la β -Gal (Cy-5, blanc) et de GATA-4 (Cy-3, rouge) sur une coculture de 7 jours entre des cardiomyocytes ROSA26R et des hMADS Cre⁺ **(D)** ou des hMADS non transduites **(E)**. **(D,E)** La flèche indique des débris de cardiomyocytes autofluorescents ; les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu). **(A-E)** Barres d'échelle : 50 μ m.

Une caractérisation immunocytochimique (ICC) plus approfondie de ces cellules hybrides nous a permis d'affiner leur phénotype. La détection de GATA-4 après 7 jours de coculture a été combinée à d'autres marqueurs cardiomyogéniques, fibroblastique, musculaire lisse ou de prolifération. Les cellules GATA-4 positives ont montré une expression concomitante de plusieurs marqueurs cardiomyogéniques précoces comme les facteurs de transcription NKX2.5 et MEF-2C (*Myocyte Enhancer Factor-2C*) (Figure 19).

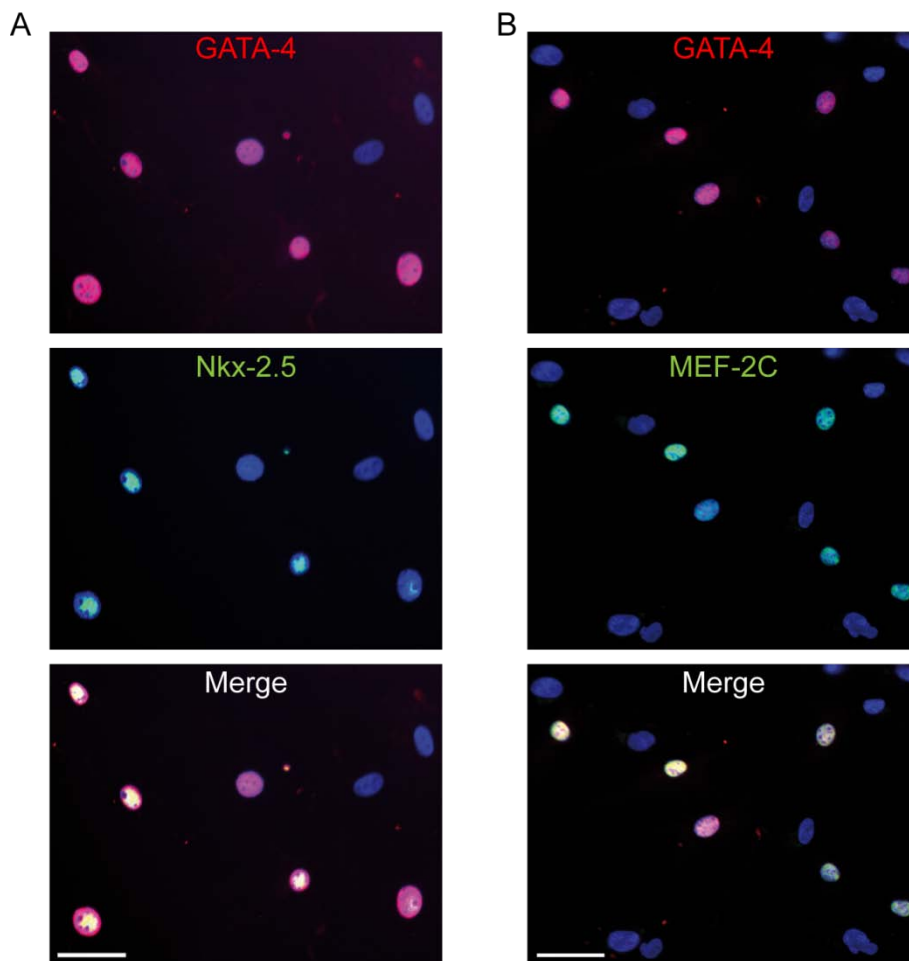


Figure 19. Expression de marqueurs cardiomyogéniques précoces par les cellules hybrides. Les cellules GATA-4⁺ (Cy-3, rouge) expriment NKX2.5 (FITC, vert) (A) et MEF-2C (FITC, vert) (B) détectés par immunocytochimie après 7 jours de coculture. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

Les cellules hybrides se sont révélées négatives pour le marqueur de l' α -SMA (α *smooth muscle actin*) (Figure 20A) et pour le marqueur fibroblastique P4HB (*prolyl four hydroxylase subunit beta*) (Figure 20B). Le phénotype cardiaque de ces cellules hybrides semble bien confirmé.

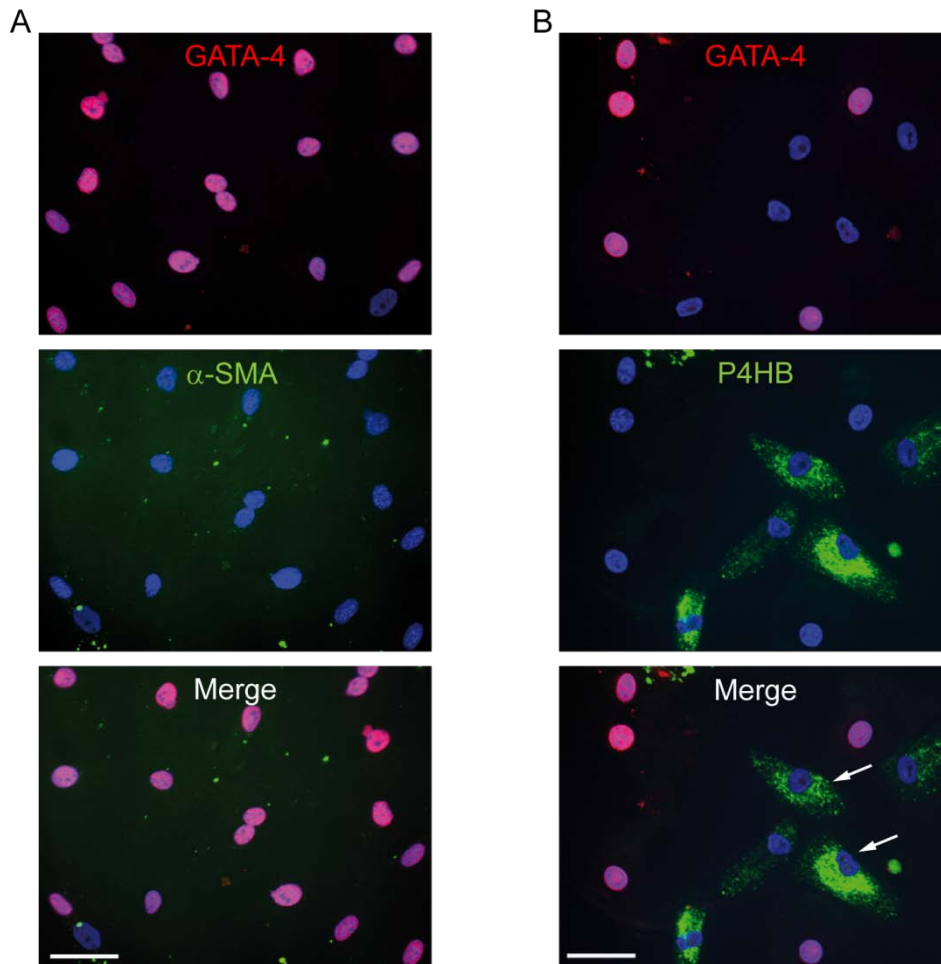


Figure 20. Les cellules hybrides possèdent un phénotype uniquement cardiaque. L'immunocytochimie après 7 jours de coculture n'a pas révélé de cellules GATA-4⁺ (Cy-3, rouge) exprimant également le marqueur de cellule musculaire lisse α -SMA (FITC, vert) **(A)** ou le marqueur fibroblastique P4HB (FITC, vert) **(B)**. Les flèches indiquent des cellules hMADS indifférenciées exprimant P4HB. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

A l'inverse, la présence de marqueurs cardiaques tardifs comme la desmine, la troponine cardiaque I (cTnI) ou l' α -actinine sarcomérique n'a été détectée que dans moins de 5% des cellules exprimant GATA-4 (Figure 21) suggérant que les cellules hybrides ont plutôt un phénotype de progéniteur cardiaque.

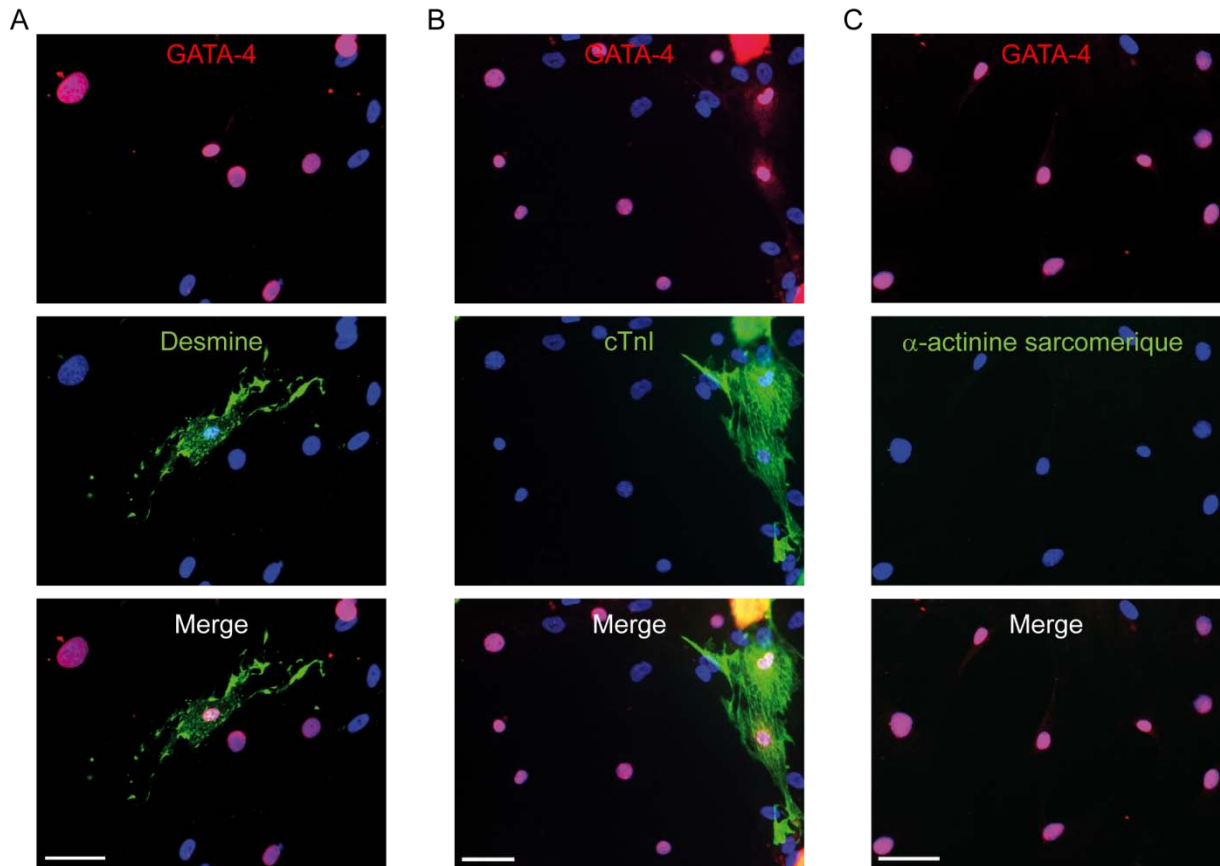


Figure 21. Cellules hybrides et expression de marqueurs cardiomyogéniques tardifs. Immunocytochimie sur des cocultures de 7 jours. De très rares cellules ont été trouvées exprimant la desmine (FITC, vert) **(A)**, la troponine cardiaque I (FITC, cTnI, vert) **(B)** et l' α -actinine sarcomérique (FITC, vert) **(C)** en association avec GATA-4 (Cy-3, rouge). Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

L'hypothèse du phénotype progéniteur des cellules hybrides a été renforcée par la présence du marqueur de prolifération Ki67, toujours associé à GATA-4 (Figure 22A) et également présent lors d'un triple marquage associant la β -Gal, GATA-4 et Ki67 (Figure 22B). Il est important de noter que les cellules hMADS cultivées seules ont été testées et se sont révélées négatives pour l'ensemble des anticorps utilisés à l'exception de P4HB et Ki67.

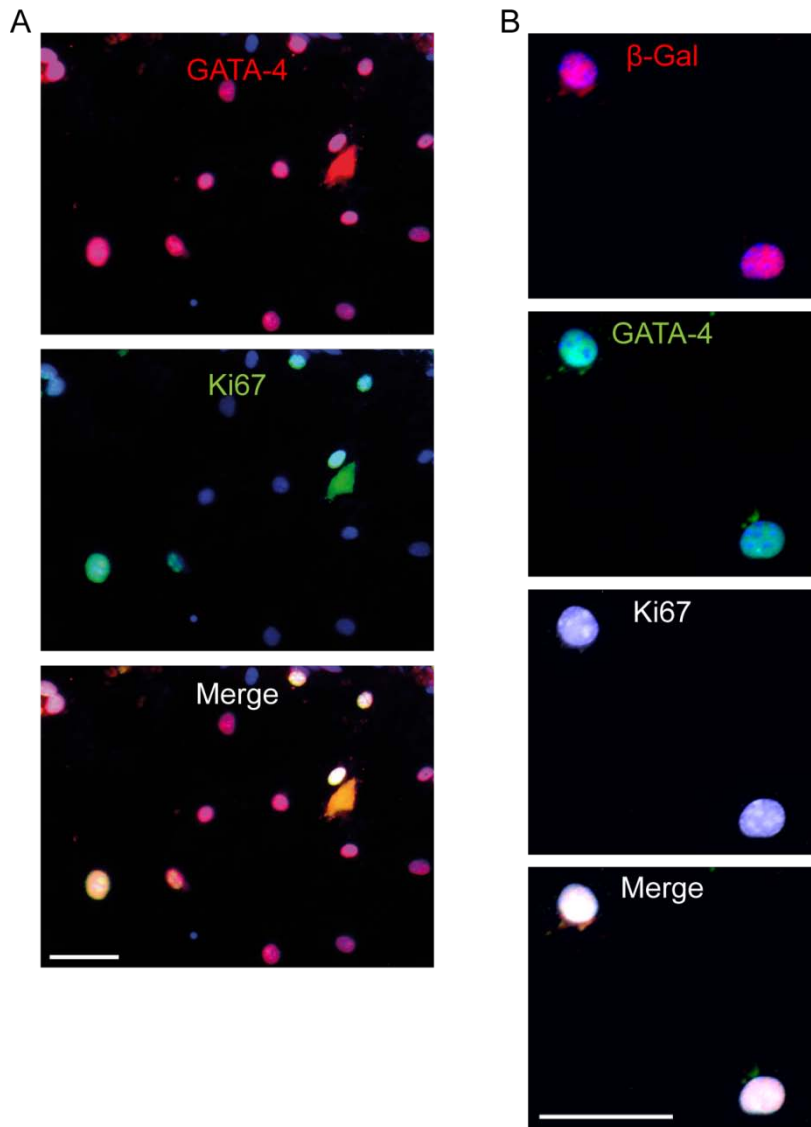


Figure 22. Capacité de prolifération des cellules hybrides. Immunomarquage de Ki67 (FITC, vert **(A)** et Cy-5, blanc **(B)**) sur des cocultures de 7 jours en association avec GATA-4 (Cy-3, rouge) **(A)** et β -Gal (Cy-3, rouge) / GATA-4 (FITC, vert) **(B)**. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

Après avoir caractérisé les cellules hybrides en termes de marqueurs cellulaires, nous avons analysé les capacités de prolifération des cellules hybrides. Le temps de doublement et la prolifération des cellules hybrides ont été analysés à partir de cocultures

entre des cellules hMADS-Cre⁺ et des cardiomyocytes ROSA26R. Nous avons montré que le temps de doublement des cellules hybrides β -Gal⁺ / GATA-4⁺ est environ de 24h heures par comptage de celles-ci entre J2 et J5 post-coculture. L'évolution au cours du temps des capacités prolifératives des cellules hybrides a ensuite été analysé à l'aide d'un marquage au MTT pratiqué entre jour 8 (J8) et jour 14 (J14) sur des cocultures préalablement déplétées en cellules humaines par traitement à l'ouabaïne. Les résultats obtenus ont confirmé non seulement la capacité de prolifération des cellules hybrides mais révèlent également que ce potentiel est limité dans le temps (inférieur à 14 jours) (Figure 23).

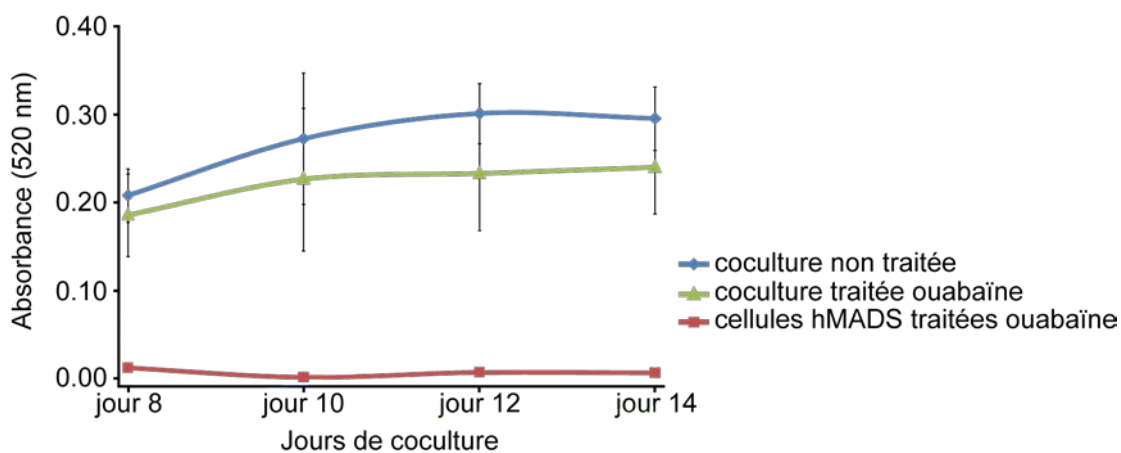


Figure 23. Prolifération des progéniteurs au sein de la coculture mesurée par MTT (courbe verte). Une coculture non traitée (courbe bleue) et des cellules hMADS traitées à l'ouabaïne (courbe rouge) ont fait office de contrôles.

Au regard de l'expression de gènes cardiomyogéniques précoces et non tardifs et du potentiel de prolifération, l'ensemble de ces résultats a suggéré que la fusion cellulaire entre des cellules hMADS et des cardiomyocytes murins adultes post-mitotiques a aboutit à la formation de cellules hybrides qui possèdent des caractéristiques de progéniteurs cardiaques.

1.3. Origine des progéniteurs cardiaques

Nous avons ensuite essayé de déterminer si les progéniteurs cardiaques hybrides provenaient de la transdifférenciation des cellules hMADS ou d'une reprogrammation nucléaire des cardiomyocytes murins. Pour répondre à cette question nous avons recherché l'origine parentale des progéniteurs. Des analyses de qRT-PCR avec des amorces spécifiques d'espèce (murine et humaine) ont été réalisées sur des cinétiques de coculture allant de jour 0 (J0) à jour 7 (J7). Nous avons choisi d'étudier les gènes correspondant au panel de protéines sélectionné en ICC lorsque le choix d'amorces spécifiques d'espèce a été possible. En plus de GATA-4, Ki67, MEF-2C et desmine, le gène P300, un activateur

transcriptionnel de GATA-4 ayant aussi une activité histone acétyltransférase (Yanazume *et al.* 2003) a été étudié. En ce qui concerne la troponine cardiaque, les formes humaine et murine étant très conservées, nous n'avons pas réussi à identifier d'amorces spécifiques d'espèce. En conséquence notre choix d'amorces s'est porté sur la sous unité T (cTnT) de la forme murine. Les niveaux d'expressions des différents gènes sont présentés en multiplication d'expression relative par rapport au J0 qui a été normalisé et qui correspond à la mise en coculture des deux types cellulaires. Les valeurs d'abondance relative des gènes humains ont été divisées par les valeurs d'abondance des cellules hMADS non cocultivées (hMADS seules) afin d'éviter un pic d'expression du gène Ki67 suite à la prolifération normale des cellules souches au sein de la coculture.

De manière surprenante, les cellules en coculture ont montré une activation de l'expression des gènes cardiomyogéniques précoces murins alors que leurs équivalents humains n'ont pas été activés (Figure 24). L'activation transcriptionnelle des gènes murins GATA-4, MEF-2C, Ki67 et P300 a en effet été multipliée respectivement par 6,5 ; 3,8 ; 7 et 4,5 après 7 jours de coculture ($p < 0.01$ par rapport au J0 pour ces 4 gènes) en comparaison de l'activation transcriptionnelle de leurs homologues humains qui n'a pas évolué et est restée stable autour de la valeur initiale. De la même manière que lors des marquages en ICC, seuls les gènes cardiomyogéniques précoces ont subi une augmentation de leur activité transcriptionnelle alors que les gènes cardiaques tardifs, la cTnT et la desmine, n'ont pas connu de variation par rapport à leur niveau d'expression à J0.

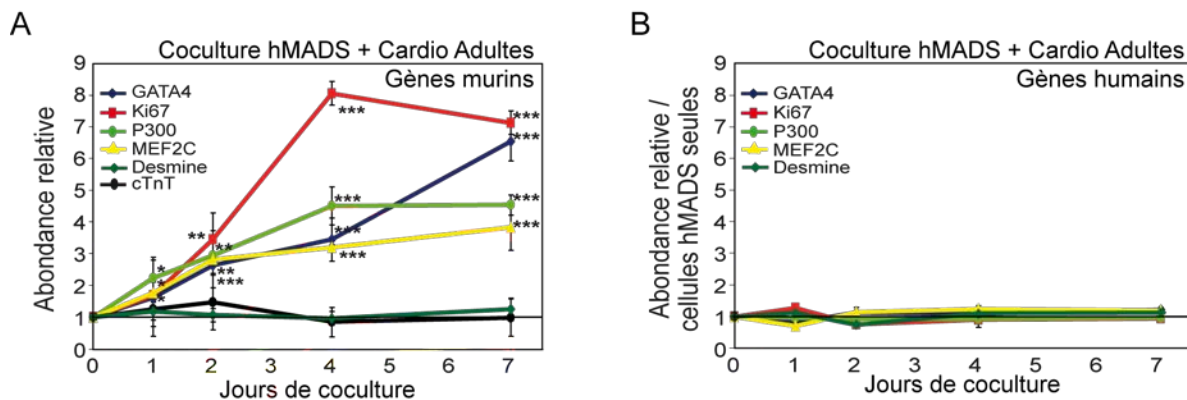


Figure 24. Reprogrammation des cardiomyocytes mesurée par qRT-PCR. Evolution de l'expression des gènes murins (A) et humains (B) au cours de la coculture entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes de J0 à J7. Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types à partir d'au moins trois expériences indépendantes. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

Ces résultats ont suggéré que les progéniteurs cardiaques hybrides avaient une origine murine. Cette origine murine des cellules hybrides cardiaques a également été

confirmée par ICC grâce à un marquage combinant GATA-4 avec des anticorps anti-lamine A/C spécifiques d'espèces (Figure 25A). Par cette technique, nous avons montré que les colonies hybrides GATA-4⁺ n'expriment pas la forme humaine de la lamine A/C.

Enfin l'origine murine des progéniteurs cardiaques murins a été confirmée en réalisant une coculture entre des cellules hMADS et des cardiomyocytes issus de la lignée de souris transgéniques exprimant la GFP de façon ubiquitaire. En accord avec les expériences précédentes, les progéniteurs GATA-4⁺ expriment également la GFP d'origine murine (Figure 25B).

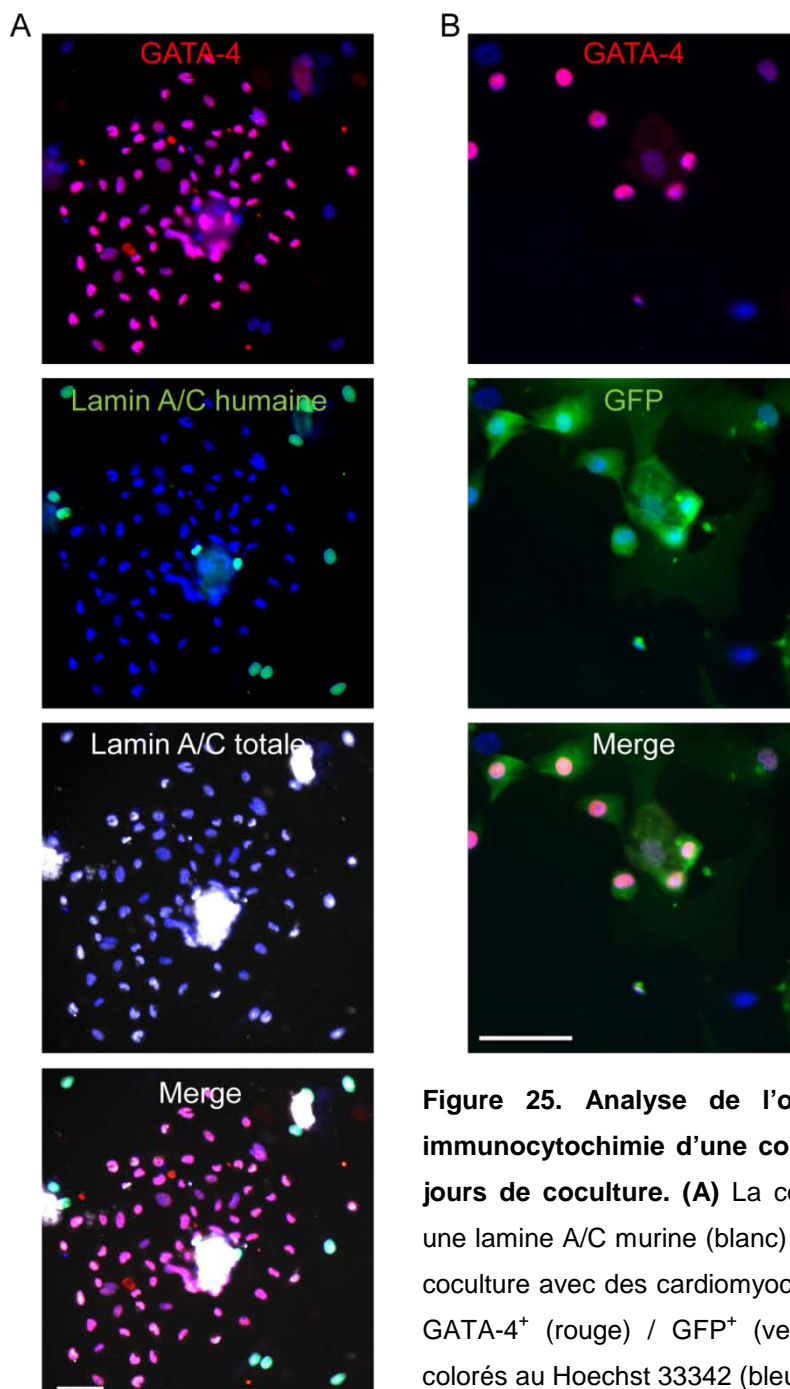


Figure 25. Analyse de l'origine des progéniteurs par immunocytochimie d'une colonie GATA-4 positive après 7 jours de coculture. (A) La colonie GATA-4⁺ (rouge) exprime une lamine A/C murine (blanc) et pas humaine (vert). **(B)** Après coculture avec des cardiomyocytes GFP⁺, les progéniteurs sont GATA-4⁺ (rouge) / GFP⁺ (vert). Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

Le phénotype murin des progéniteurs hybrides cardiaques va donc à l'encontre d'un phénomène de transdifférenciation des cellules hMADS dans la voie cardiomyocytaire et soutient une reprogrammation du noyau du cardiomyocyte adulte vers un stade plus immature de progéniteur.

Afin de montrer le rôle de la fusion entre les deux types cellulaires dans la reprogrammation des cardiomyocytes, nous avons effectué des cocultures en présence d'un insert de culture constitué d'une membrane semi-perméable de 0,4 μm de seuil. Ces membranes, très sélectives, ne sont perméables qu'aux facteurs solubles et inhibent tout contact cellulaire ou passage d'organites. Une deuxième série d'expérience a consisté à réaliser des cocultures avec des cellules hMADS fixées à la PFA. Cette technique de fixation a été montrée comme inhibant les phénomènes de fusion entre des spermatozoïdes et des œufs d'oursin ou entre des cellules souches neurales et des cellules endothéliales tout en permettant la reconnaissance et les associations entre récepteurs de ces cellules (Vacquier 1979; Wurmser *et al.* 2004). Dans ces deux conditions (insert et PFA), aucune reprogrammation n'a été observée ce qui indique que les signaux véhiculés par des molécules solubles ou bien les interactions cellule-cellule via des récepteurs membranaires n'interviennent pas ou peu dans la reprogrammation et dans la génération des cellules hybrides progénitrices cardiaques (Figure 26).

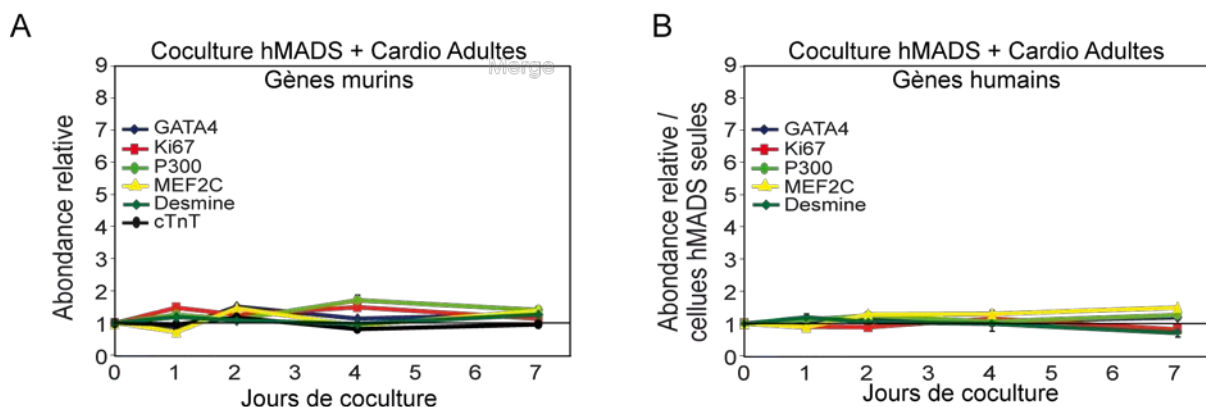


Figure 26. Importance des contacts cellule-cellule dans la reprogrammation mesurée par qRT-PCR. (A) En présence d'une membrane semi-perméable inhibant le contact entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes, aucune modification de l'expression des gènes murins ne se produit. **(B)** L'inhibition des contacts n'a pas d'effet sur l'expression des gènes humains. Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types à partir d'au moins trois expériences indépendantes.

Nous avons également évalué la fréquence de reprogrammation des cardiomyocytes murins adultes. Pour ce faire, nous avons traité les cocultures Cre / ROSA26 à la

mitomycine C pour inhiber la prolifération des cellules hybrides. Dans ce contexte, le comptage des cellules β -Gal⁺ / GATA-4⁺ permet d'évaluer le taux de reprogrammation des cardiomyocytes. Le nombre de cellules double positives a été en moyenne de 10 pour 100 000 cardiomyocytes. Néanmoins, les étapes d'isolement de mise en coculture dans nos conditions ont représenté des moments de stress pour les cardiomyocytes qui ont été nombreux à être endommagés et à ne pas survivre lors de la mise en coculture comme cela est montré après un marquage à l'iodure de propidium et analyse au cytomètre en flux (Figure 27). En tenant compte de la proportion de cardiomyocytes mourant au moment de l'initiation de la coculture (estimée à 90%), le pourcentage de cardiomyocytes susceptibles d'être reprogrammés n'est que de 10% et le taux de reprogrammation serait donc d'environ 0,1%.

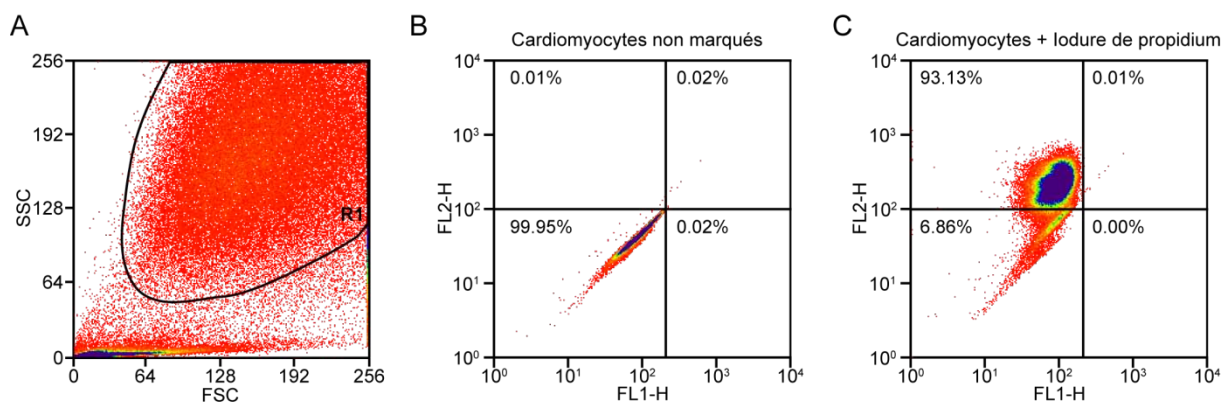


Figure 27. Taux de survie des cardiomyocytes après dissociation cardiaque. (A) La population de cardiomyocytes de la région R1 a été sélectionnée de façon à exclure les débris de l'analyse. **(B)** Analyse par cytométrie en flux de la compensation pour les canaux FL1-H (FITC) et FL2-H (Phycoérythrine) des cardiomyocytes non marqués. **(C)** Analyse par cytométrie en flux des cardiomyocytes après incubation à l'iodure de propidium.

1.4. Reprogrammation et fusion partielle

Après avoir démontré le rôle de la fusion dans la reprogrammation des cardiomyocytes adultes, nous avons voulu déterminer quel était le type de fusion impliqué dans l'apparition des cellules hybrides. En effet, deux modalités de fusion ont été décrites à ce jour dans la littérature : une modalité de fusion permanente et une de fusion partielle. Le modèle de fusion permanente a déjà été mis en évidence *in vivo* (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Johansson *et al.* 2008; Terada *et al.* 2002) et peut se manifester sous différents aspects (hétérokaryon ou synkaryon) comme cela a été décrit précédemment dans l'introduction. Le deuxième processus, qualifié de fusion partielle, intervient sous la forme d'échanges de matériel entre deux cellules comme cela a été montré pour le

transfert de mitochondries des cellules souches vers les cardiomyocytes néonataux (Plotnikov *et al.* 2008). Cette modalité de fusion fait intervenir des structures de communications intercellulaires appelées nanotubes (Cselenyak *et al.* 2010; Onfelt *et al.* 2006; Rustom *et al.* 2004).

Les phénomènes de fusion permanente ont été recherchés par des expériences de FISH en utilisant des sondes nucléaires spécifiques d'espèce (Figure 28A, B). Le nombre de synkaryons doublement marqués détectés par cette méthode a été très faible, environ 1 noyau sur 200 cellules hybrides (Figure 28C). De plus, aucun hétérokaryon n'a été observé avant l'apparition des progéniteurs cardiaques hybrides mononucléés, entre 0 et 48 heures et les cellules ayant une morphologie identiques à celles présentes au sein des colonies GATA-4⁺ / β -Gal⁺ ont un contenu nucléaire uniquement murin (Figure 28D). Enfin, les cellules exprimant GATA-4 ont un noyau contenant uniquement de l'ADN murin (Figure 28E, F). L'ensemble de ces données va à l'encontre d'un phénomène de fusion permanente comme mécanisme principal responsable de la formation des progéniteurs cardiaques.

D'autres données sont venues appuyer ces résultats ; en particulier des images de microscopie en temps réel et de microscopie électronique qui ont apporté des arguments en faveur de la fusion partielle. La microscopie en temps réel a permis de souligner une continuité membranaire entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes par l'intermédiaire de structures ressemblant aux nanotubes décrits dans la littérature et permettant une communication entre les deux types cellulaires (Figure 29A, B). La microscopie électronique a révélé deux autres types d'interactions entre les cellules souches et les cardiomyocytes. La première a consisté en de longues et minces protrusions joignant des cellules distantes (Figure 29C) et différant des nanotubes du fait qu'elles ont adhéré à la boîte de culture contrairement à ces derniers qui sont décrits comme non adhérents (Gurke *et al.* 2008). L'autre interaction a été constatée entre deux cellules en contact qui, au niveau de certains points focaux ont pu connaître des disparitions de leurs membranes plasmiques au profit d'une mise en contact de leurs cytoplasmes respectifs (Figure 29D-G).

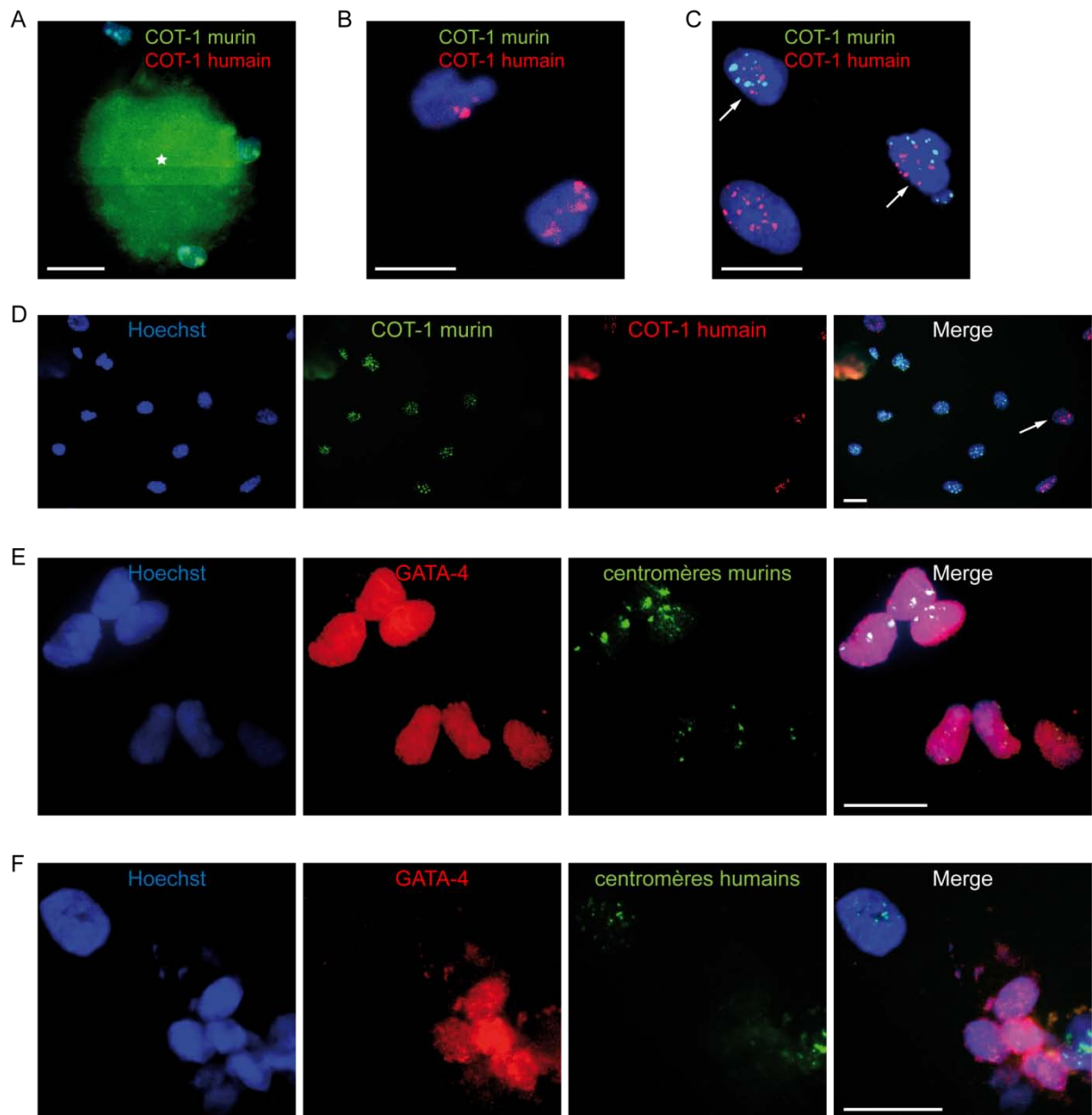


Figure 28. Analyse de la fusion permanente dans les cocultures. (A-D) FISH à l'aide de sondes chromosomiques murines (COT-1 FITC, vert) et humaines (COT-1 Cy-3, rouge). **(A, B)** Contrôle de la spécificité des sondes COT-1 utilisées sur des cardiomyocytes seuls **(A)** et des cellules hMADS seules **(B)**. L'étoile indique un agrégat de débris de cellules cardiaques. **(C)** Détection de synkaryons (flèches) contenant à la fois de l'ADN humain et murin après 48 heures de coculture. **(D)** Au sein d'une colonie à J5, les noyaux des cellules contiennent uniquement de l'ADN murin (vert). La flèche désigne une cellule humaine (rouge) n'appartenant pas à la colonie. **(E, F)** Immunocytochimie anti-GATA-4 combinée à un FISH marquant tous les centromères murins ou humains (FITC, vert) après 48 heures de coculture. **(E)** Confirmation du contenu nucléaire uniquement murin (vert) des noyaux GATA-4⁺. **(F)** Les cellules dont l'ADN est humain (vert) n'expriment pas GATA-4. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 20 µm.

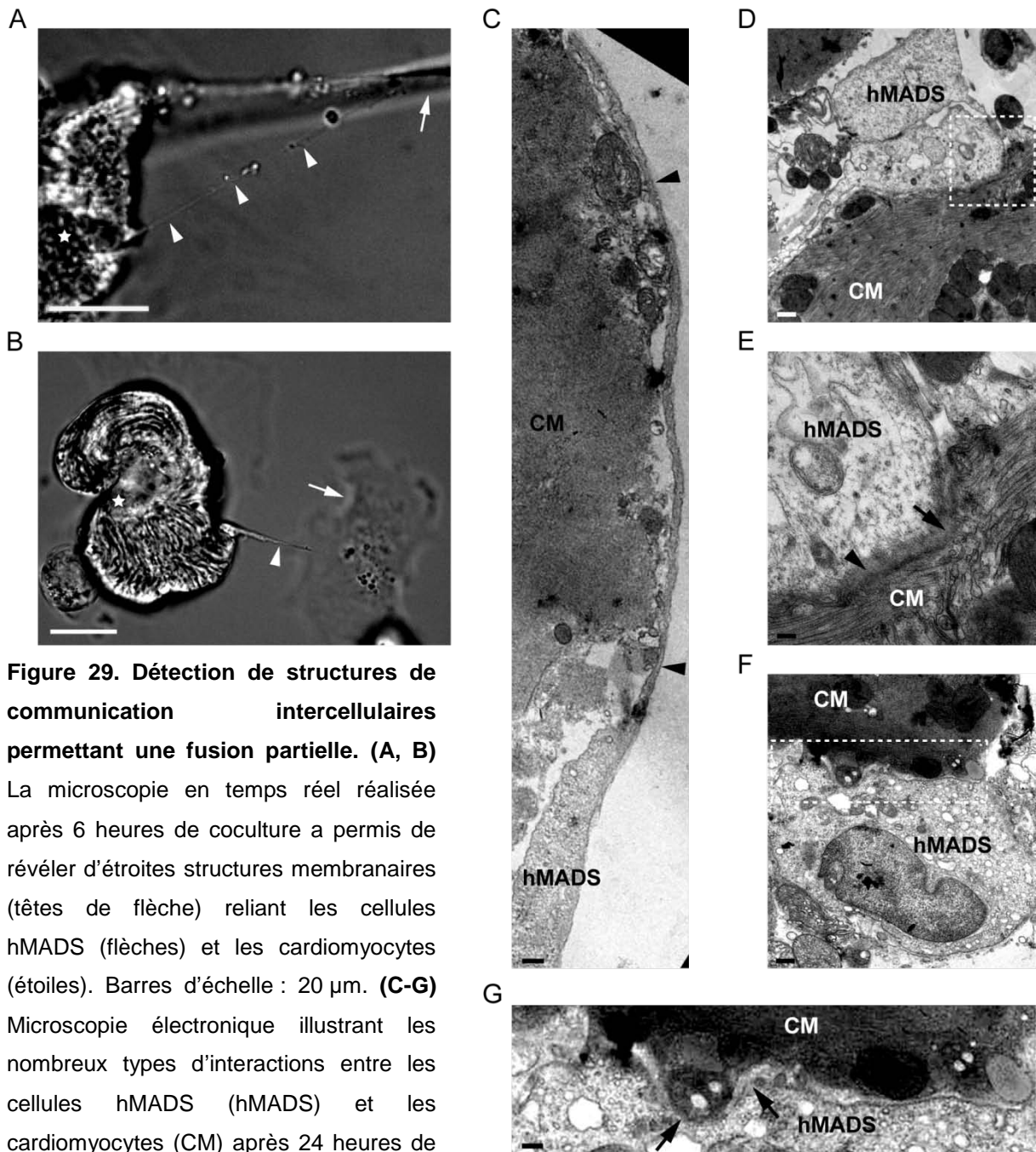


Figure 29. Détection de structures de communication intercellulaires permettant une fusion partielle. (A, B)

La microscopie en temps réel réalisée après 6 heures de coculture a permis de révéler d'étroites structures membranaires (têtes de flèche) reliant les cellules hMADS (flèches) et les cardiomyocytes (étoiles). Barres d'échelle : 20 μ m. **(C-G)**

Microscopie électronique illustrant les nombreux types d'interactions entre les cellules hMADS (hMADS) et les cardiomyocytes (CM) après 24 heures de coculture. **(C-E)** Longues et fines protubérances connectant des cellules hMADS et des cardiomyocytes distants. **(C)** Vue partielle d'une protubérance (têtes de flèche) issue d'une cellule hMADS entourant la membrane d'un cardiomyocyte. Barre d'échelle : 378 nm. **(D)** Partie terminale d'une protubérance. Barre d'échelle : 644 nm. **(E)** Vue élargie de la zone de contact encadrée en **(D)** avec suspicion d'une perte de contact (flèche) entre les membranes et mise en commun des cytoplasmes. Barre d'échelle : 275 nm. **(F)** Illustration de la proximité des membranes. Barre d'échelle : 863 nm. **(G)** Vue élargie du site de contact montré en **(F)** suggérant des points de rupture membranaire (flèches). Barre d'échelle : 410 nm.

D'après la définition et le rôle des nanotubes décrits dans la littérature, nous nous sommes focalisés sur ces structures et leur implication possible dans la reprogrammation des cardiomyocytes. En effet ce système de communication, découvert récemment (Rustom *et al.* 2004) présente des caractéristiques qui pourraient nous aider à mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la reprogrammation. Les nanotubes, présents chez la plupart des cellules animales sont un moyen de communication transitoire privilégié pour le transfert de grosses molécules comme des récepteurs membranaires ou encore des organites (Rustom *et al.* 2004). Ils permettent des communications sur de longues distances (plusieurs dizaines de micromètres) et sont classés en fonction de leur composition protéique qui peut être de la f-actine (microfilaments), de la tubuline (microtubules) ou une association des deux (Onfelt *et al.* 2006). Un marquage de ces structures à l'aide d'une part de phalloïdine-TRITC qui reconnaît le cytosquelette d'actine et d'autre part d'un anticorps dirigé contre l' α -tubuline a révélé que ces deux protéines entraient dans la composition des nanotubes détectés dans nos cocultures (Figure 30A, B).

1.5. Implication des nanotubes dans la fusion partielle et dans la reprogrammation des cardiomyocytes

Après avoir élucidé la composition des nanotubes, nous avons voulu déterminer l'implication de ces structures dans la reprogrammation du cardiomyocyte, c'est pourquoi des inhibiteurs de polymérisation ont été utilisés et leurs conséquences sur la reprogrammation ont été étudiées. La synthèse des filaments de f-actine a été inhibée par deux molécules : la cytochalasine D et la latrunculine A et la polymérisation des microtubules a été stoppée par un traitement au nocodazole. Ces poisons moléculaires étant toxiques, les temps de contact avec les cellules n'ont pas excédé 12 heures et ont été répétés à trois reprises sur une durée totale de 7 jours. Les conséquences sur l'expression des gènes cardiaques humains et murins ont été analysées après 7 jours de coculture par qRT-PCR et ont été comparés aux cocultures non traitées (Figure 30C). L'action des trois drogues a engendré une diminution de l'expression du gène cardiaque précoce murin GATA-4 avec une abondance relative de 0,7 ; 0,6 et 0,82 après traitement respectif au nocodazole, à la cytochalasine D et à la latrunculine A. Malgré une différence significative avec le témoin concernant le gène murin MEF-2C ; 1,53 et 1,3 d'abondance relative respectivement après traitement au nocodazole et à la latrunculine A, l'augmentation de l'expression n'a pas été suffisante par rapport à l'expression relevée dans le contrôle pour l'interprétation de cette donnée. Néanmoins, la baisse d'expression

de GATA-4 a été accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes cardiaques tardifs murins avec des valeurs d'abondance relative de 3 ; 3,8 et 2 pour la desmine et 2,7 ; 3,1 et 2,8 pour la troponine cardiaque T respectivement pour le nocodazole, la cytochalasine D et la latrunculine A. La diminution de l'activité transcriptionnelle du gène cardiaque précoce GATA-4 et l'augmentation de transcription des gènes tardifs constatées lors de l'ajout des drogues inhibant la formation des nanotubes indiquent une inhibition de la reprogrammation du cardiomyocyte vers un stade plus immature. De plus les données correspondant à l'analyse des gènes humains (Figure 30D) ont montré une forte activation de la transcription de GATA-4 dans les trois conditions d'inhibition (abondances relatives de 4,4 ; 3,3 et 2,2 respectivement pour le nocodazole, la cytochalasine D et la latrunculine A) ainsi qu'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la desmine après traitement à la cytochalasine D (2,9) et à la latrunculine A (2,2). L'expression des transcrits de MEF-2C par contre n'a pas évolué de manière significative. Ces résultats sur les variations d'expression des gènes humains suggèrent qu'en l'absence de contacts cellulaires, les cellules hMADS s'engagent vers une voie de transdifférenciation cardiomyogénique.

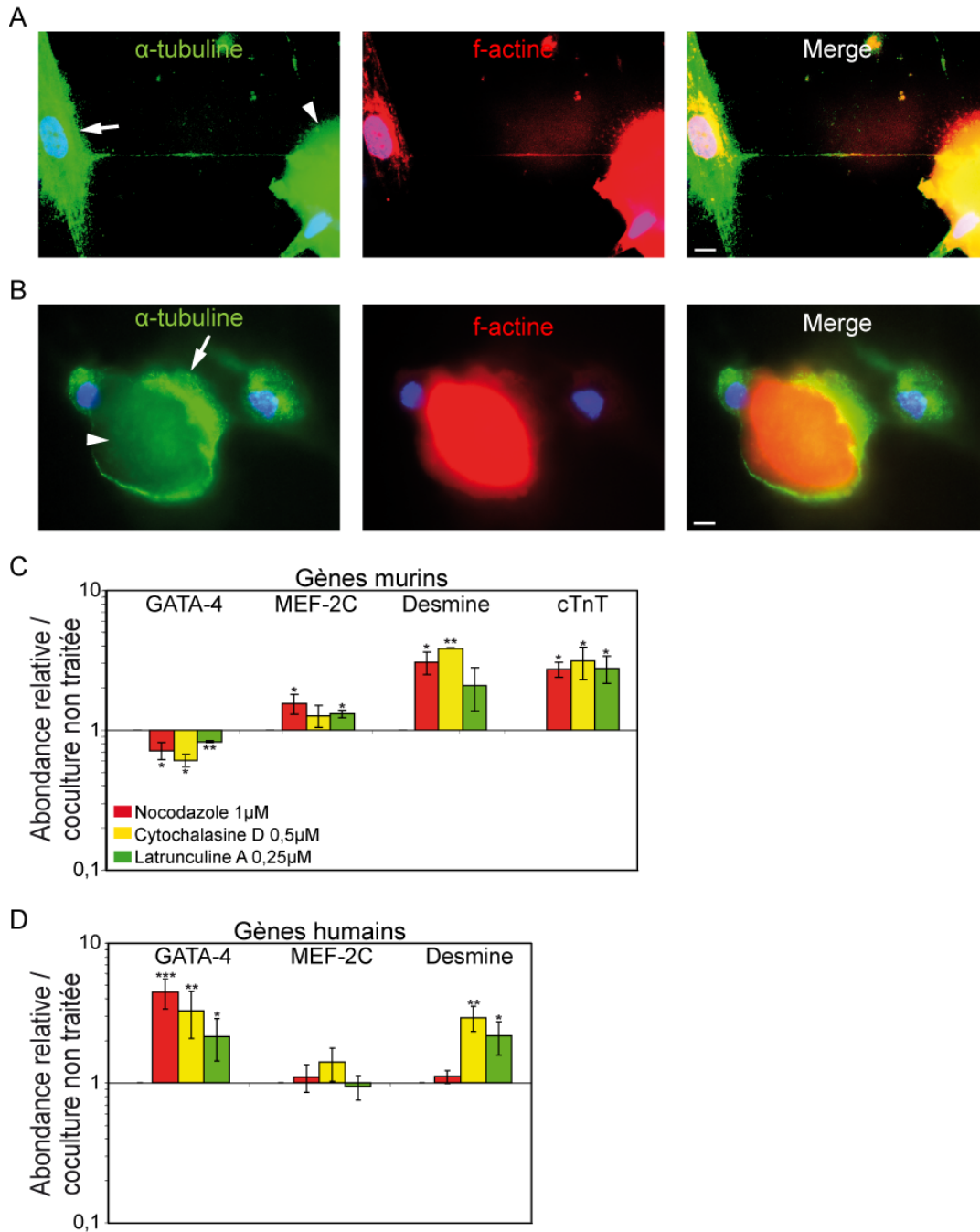


Figure 30. Implication des filaments de f-actine et des microtubules dans la reprogrammation des cardiomyocytes. (A) Six heures après le début de la coculture, des filaments composés de f-actine (rhodamine-phalloïdine, rouge) et de microtubules (FITC, vert) permettent la connexion des cellules souches (flèche) et des cardiomyocytes (tête de flèche). **(B)** Contact membranaire étroit entre une cellule hMADS (flèche) et un cardiomyocyte (tête de flèche) montrant la concentration en microtubules (vert) et en f-actine (rouge) au niveau du site de contact. **(A,B)** Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 10 μ m. **(C, D)** Inhibition de la reprogrammation après traitement aux inhibiteurs de polymérisation de la f-actine (cytochalasine D 0,5 μ M et latrunculine A 0,25 μ M) et de microtubules (nocodazole 1 μ M) analysée par qRT-PCR après 7 jours de coculture. Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types à partir d'au moins trois expériences indépendantes. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

Des marquages immunocytochimiques en présence des inhibiteurs de synthèse des nanotubes ont été menés pour étudier le degré de transdifférenciation cardiaque des cellules hMADS en coculture. Ces marquages ont permis dans un premier temps de mettre en évidence une diminution importante du nombre de cellules doubles positives pour GATA-4 et lamine A/C murine au sein des colonies de progéniteurs (données non montrées). Dans un second temps, des cellules GATA-4 positives ont été détectées en association avec l'expression de lamine A/C d'origine humaine (Figure 31), supportant l'hypothèse d'une transdifférenciation des cellules hMADS en l'absence de transferts de matériel cytoplasmique et nucléaire. Cependant, les protéines MEF-2C, troponine cardiaque I et desmine n'ont pas été détectées après 7 jours de coculture, appuyant l'hypothèse d'une transdifférenciation incomplète des cellules souches humaines. Les effets des drogues sur des cellules hMADS seules non cocultivées ont été évalués et n'ont montré aucune activation d'un programme cardiomyogénique (données non montrées).

Aucune différence significative sur les expressions des différents gènes analysés n'a été observée entre les trois drogues ce qui a montré l'action simultanée et indispensable des nanotubes composés à la fois de f-actine et de microtubules.

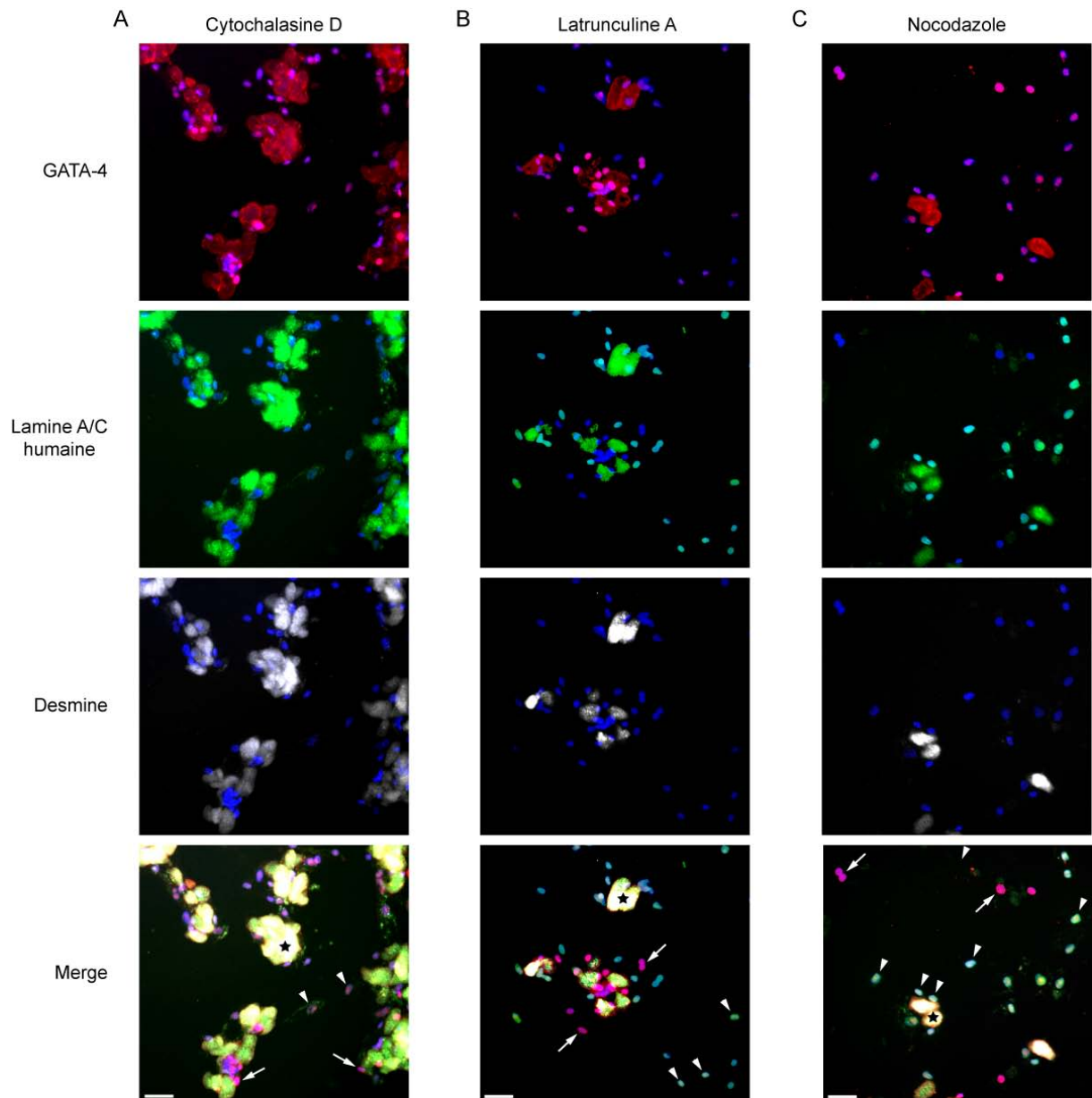


Figure 31. Transdifférenciation partielle des cellules hMADS en coculture après exposition aux inhibiteurs de polymérisation des nanotubes. (A-C) Co-immunomarquage de GATA-4 (Cy-3, rouge), lamine A/C humaine (FITC, vert) et desmine (Cy-5, blanc) sur des cocultures de 7 jours après traitement à la cytochalasine D **(A)**, à la latrunculine A **(B)** et au nocodazole **(C)**. En présence des drogues, certaines cellules humaines positives pour la lamine A/C humaine expriment GATA-4 mais pas la desmine (têtes de flèches). De plus le nombre de progéniteurs GATA-4⁺ / lamine A/C humaine⁻ et desmine⁻ est plus faible (flèches) que dans les cocultures non traitées. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

1.6. Transfert des mitochondries humaines et reprogrammation

Etant donné que des transferts de mitochondries des cellules souches vers les cardiomyocytes ont été antérieurement décrits dans des systèmes de coculture (Plotnikov *et al.* 2008), nous avons voulu déterminer si un tel transfert avait lieu dans notre configuration. Après marquage des mitochondries humaines et mise en coculture avec les cardiomyocytes adultes, les organites fluorescents humains ont été retrouvés dans le cytoplasme des cellules murines après 12 heures de coculture (Figure 32A).

Une coculture en présence d'une membrane semi-perméable de 0,8 μm de seuil a montré qu'en l'absence de contacts intercellulaires, la proportion de mitochondries transférées de la cellule souche vers le cardiomyocyte était largement diminuée (données non montrées). Cette donnée suggère que la présence de mitochondries humaines dans le cardiomyocyte murin ne résulte pas d'un transfert via le milieu extracellulaire par capture de débris ou de corps apoptotiques mais bien que ce transfert de mitochondries a été assuré par un phénomène mettant en jeu des structures intercellulaires comme cela est montré dans la Figure 32A.

Les mitochondries transférées, détectées 12 heures après le début de la coculture ont également été retrouvées dans les cellules progénitrices $\beta\text{-Gal}^+$ / GATA-4^+ à J7 comme nous avons pu l'observer après une coculture entre des cellules hMADS- Cre^+ et des cardiomyocytes ROSA26R (Figure 32B, C).

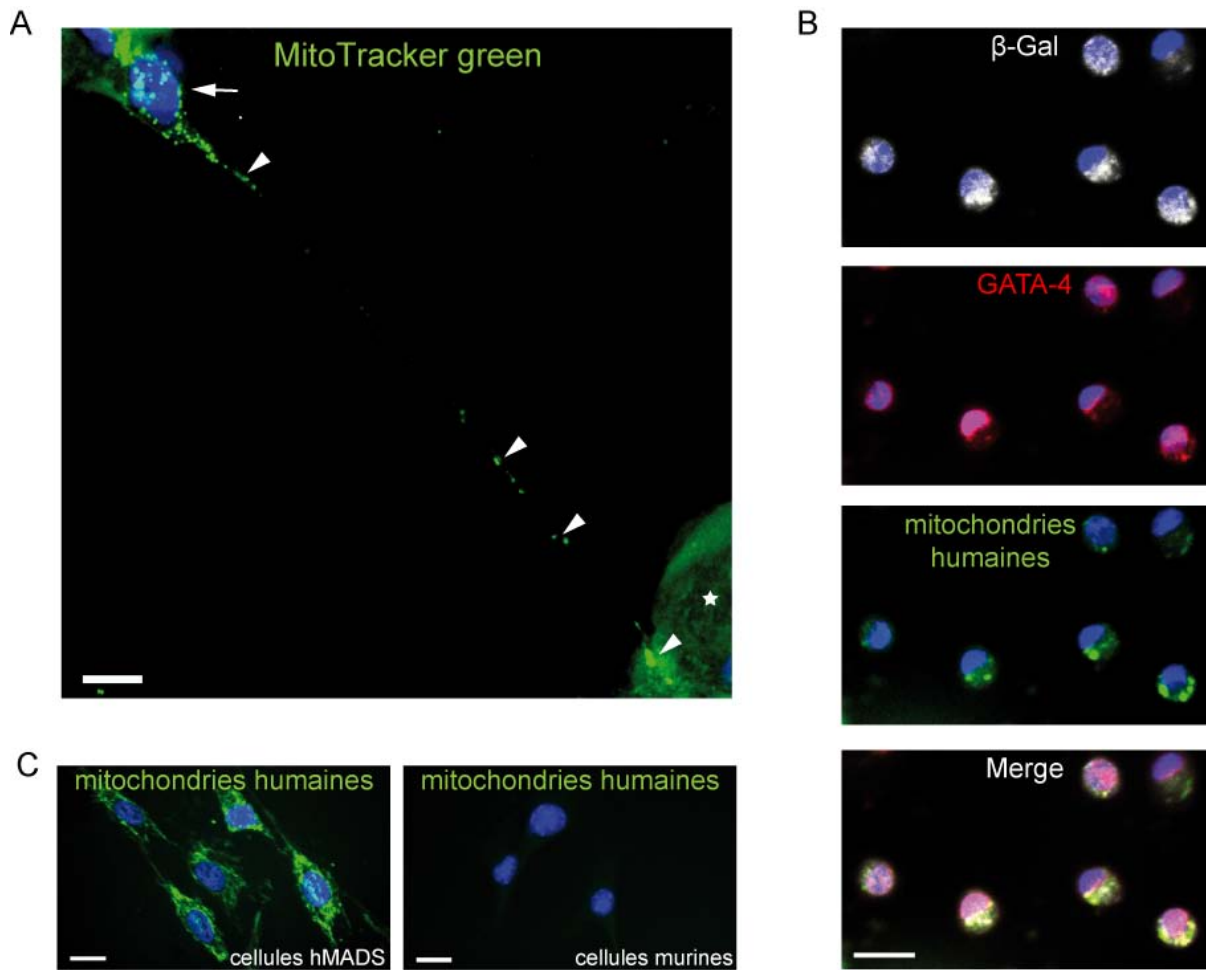


Figure 32. Transfert de mitochondries humaines vers les cardiomyocytes et présence de ces organites dans les progéniteurs cardiaques murins. (A) Présence de mitochondries humaines (têtes de flèche, MitoTracker Green, vert) à l'intérieur d'une structure nanotubulaire entre une cellule hMADS (flèche) et un cardiomyocyte (étoile) après 12 heures de coculture et fixation à la PFA 4%. **(B)** Malgré leur phénotype murin, les cellules hybrides β -Gal⁺ / GATA-4⁺ contiennent des mitochondries humaines (FITC, vert) dans leur cytoplasme. **(C)** Contrôle de spécificité de l'anticorps anti-mitochondries humaines utilisé (FITC, vert). Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 20 μ m.

Au regard de ces résultats sur les cellules progénitrices et sur l'importance des nanotubes dans la reprogrammation, le rôle des mitochondries dans ce phénomène a été investigué grâce à la création d'une lignée de cellules hMADS déplétée en mitochondries (hMADS ρ 0) après traitement au bromure d'éthidium (BET) sur une longue période (supérieure à 1 mois). En effet, l'ajout de BET dans le milieu de culture à faible concentration (0,5 μ g/mL) permet la déplétion de l'ADN mitochondrial sans altérer l'ADN nucléaire comme cela a été rapporté antérieurement dans la littérature pour d'autres types cellulaires (King et Attardi 1989; Miller *et al.* 1996; Spees *et al.* 2006). Après avoir

confirmé l'absence de mitochondries dans les cellules hMADS $\rho 0$ (environ 95%, Figure 33A) celles-ci ont été transduites par la Cre et leur capacité de fusion a été analysée par coculture avec des cardiomyocytes ROSA26R et comparée à une coculture contrôle. La proportion de cellules β -Gal⁺ / GATA-4⁺ issues de la coculture avec les cellules hMADS $\rho 0$ a été réduite de 70 à 90% par rapport à la coculture témoin (Figure 33B, C). Ce résultat indique l'importance du transfert de mitochondries fonctionnelles de la cellule souche vers le cardiomyocyte pour que ce dernier puisse se reprogrammer. Le faible taux de reprogrammation détecté en ICC résulte probablement de la fusion de quelques cellules hMADS présentes dans la lignée $\rho 0$ dont les mitochondries n'ont pas été altérées (proportion estimée à 5% après marquage au Mitotracker Green). L'importance du transfert de mitochondries pour la reprogrammation du cardiomyocyte a été confirmée en qRT-PCR (Figure 33D). L'activation des gènes cardiaques précoces et tardifs murins ont subi une diminution significative de transcription avec des valeurs d'abondance relative de 0,43 pour GATA-4 ; 0,22 pour MEF-2C ; 0,02 pour la desmine et 0,07 pour la troponine cardiaque T. La diminution relativement peu importante d'un facteur 2,3 pour GATA-4 et d'un facteur 4,5 pour MEF-2C peut s'expliquer par la présence des quelques cellules hybrides cardiaques β -Gal⁺ / GATA-4⁺ détectées en ICC, alors que l'effondrement des transcrits de la desmine et de la troponine cardiaque T traduit une diminution drastique de la capacité de survie des cardiomyocytes en l'absence de transfert de mitochondries humaines et leur incapacité à se reprogrammer. L'inhibition de la reprogrammation constatée dans ces conditions va de pair avec l'augmentation du nombre de transcrits humains de GATA-4, suggérant une entrée en différenciation des cellules hMADS dans la voie cardiomyogénique (Figure 33E).

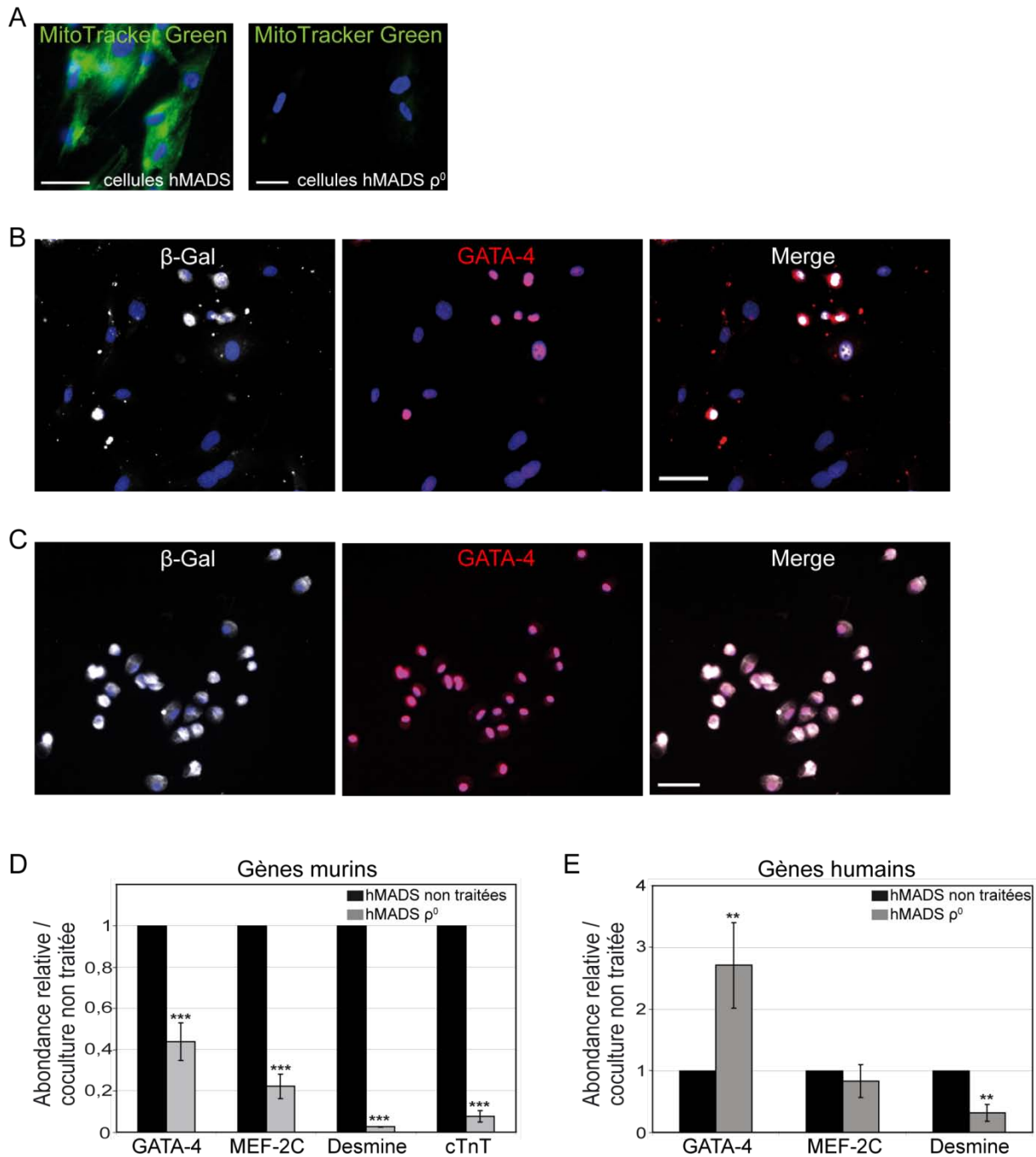


Figure 33. Rôle du transfert de mitochondries dans la reprogrammation. (A) Marquage au MitoTracker Green (vert) indiquant la déplétion en mitochondries de la lignée hMADS ρ^0 (panneau de droite) par rapport à des cellules hMADS contrôle (panneau de gauche). **(B)** Une coculture à 7 jours entre les cellules hMADS ρ^0 et des cardiomyocytes ROSA26R montrant un nombre réduit de progéniteurs β -Gal⁺ / GATA-4⁺ comparée à une coculture témoin **(C)**. **(D, E)** QRT-PCR montrant l'expression des gènes cardiaques murins **(D)** et humains **(E)** d'une coculture entre cellules hMADS ρ^0 et cardiomyocytes ROSA26R comparée à une coculture avec des cellules hMADS non déplétées en mitochondries. Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types obtenus à partir d'au moins trois expériences indépendantes. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

2. Analyse du potentiel de reprogrammation des cardiomyocytes par d'autres types cellulaires

Nous avons voulu déterminer si le potentiel de reprogrammation des cellules hMADS leur était spécifique ou bien si d'autres types cellulaires partageaient cette capacité. Le premier type cellulaire choisi a été des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM) dérivées de moelle osseuse. Les analyses pratiquées ont été du même ordre que celles réalisées avec les cellules hMADS. Après avoir mis en évidence l'apparition dans les cocultures de cellules morphologiquement différentes des cellules souches et des cardiomyocytes *in vitro*, une exploration phénotypique de ces cellules a été menée. Dans les cocultures, les cellules exprimant GATA-4 expriment également NKX2.5, la lamine A/C d'origine murine et le marqueur de prolifération Ki67 (Figure 34).

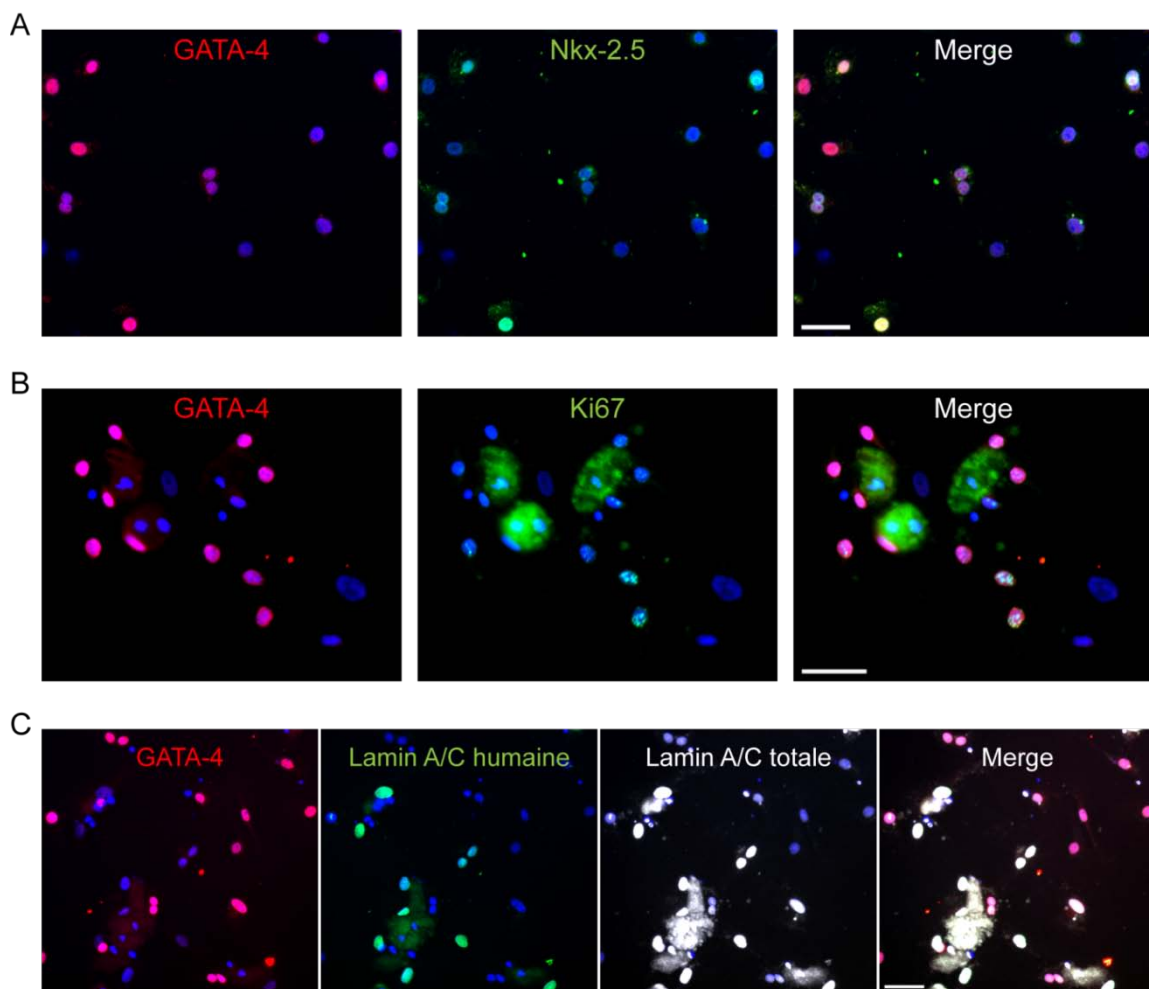


Figure 34. Caractérisation phénotypique par immunocytochimie des cellules issues de la coculture entre des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse et des cardiomyocytes adultes. Les cellules GATA-4⁺ (Cy-3, rouge) expriment NKX2.5 (FITC, vert) **(A)**, Ki67 (FITC, vert) **(B)** et la lamine A/C d'origine murine (Cy-5, blanc) **(C)**. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

Les expériences de qRT-PCR ont révélé le même profil d'activation transcriptionnelle que les cellules hMADS à savoir une augmentation significative de la transcription des gènes cardiaques précoces et de prolifération murins GATA-4, MEF-2C, P300 et Ki67 et l'absence d'activation des gènes cardiaques tardifs de la desmine et de la troponine cardiaque T (Figure 35A) ainsi qu'une absence d'activation de tous les gènes humains testés (Figure 35B). Les résultats obtenus en ICC et qRT-PCR montrent donc que les CSM possèdent des caractéristiques similaires en termes de reprogrammation à celles des cellules hMADS. Cependant il est important de noter que ces expériences de cocultures ont été réalisées avec des CSM cultivées à des passages précoces (passages 2 à 3). Des tentatives de cocultures à des passages plus tardifs se sont soldés par des résultats décevants tant au niveau de la coculture en elle-même (morphologie des MSC et interactions avec les cardiomyocytes) que des analyses en qRT-PCR qui démontrent l'absence de reprogrammation (données non montrées).

Le deuxième type de cocultures a été effectué entre des cardiomyocytes et des fibroblastes pulmonaires humains de la lignée MRC5. Ces cellules ont été choisies car elles sont douées d'une capacité de prolifération mais dépourvues de plasticité. Contrairement aux cellules hMADS et aux CSM de moelle osseuse, les fibroblastes humains ne sont pas capables de reprogrammer les cardiomyocytes en coculture. Malgré une augmentation significative à partir de J4 des transcrits de GATA-4, aucun autre gène cardiaque précoce murin (MEF-2C, P300) n'a été activé (Figure 35C), suggérant une reprogrammation incomplète des cardiomyocytes. Une étude en ICC de cocultures entre des MRC5 Cre⁺ et des cardiomyocytes ROSA26R a confirmé l'absence de cellules hybrides β -Gal⁺ / GATA-4⁺ et donc l'absence de fusion entre ces deux types cellulaires (résultats non montrés). Du côté des gènes humains, l'analyse en qRT-PCR a montré que seul GATA-4 a subi une augmentation de transcription (Figure 35D). Ce phénomène peut à nouveau être interpréter comme un engagement des fibroblastes dans la voie cardiomyogénique mais nous n'avons pas exploré cette possibilité plus en détails.

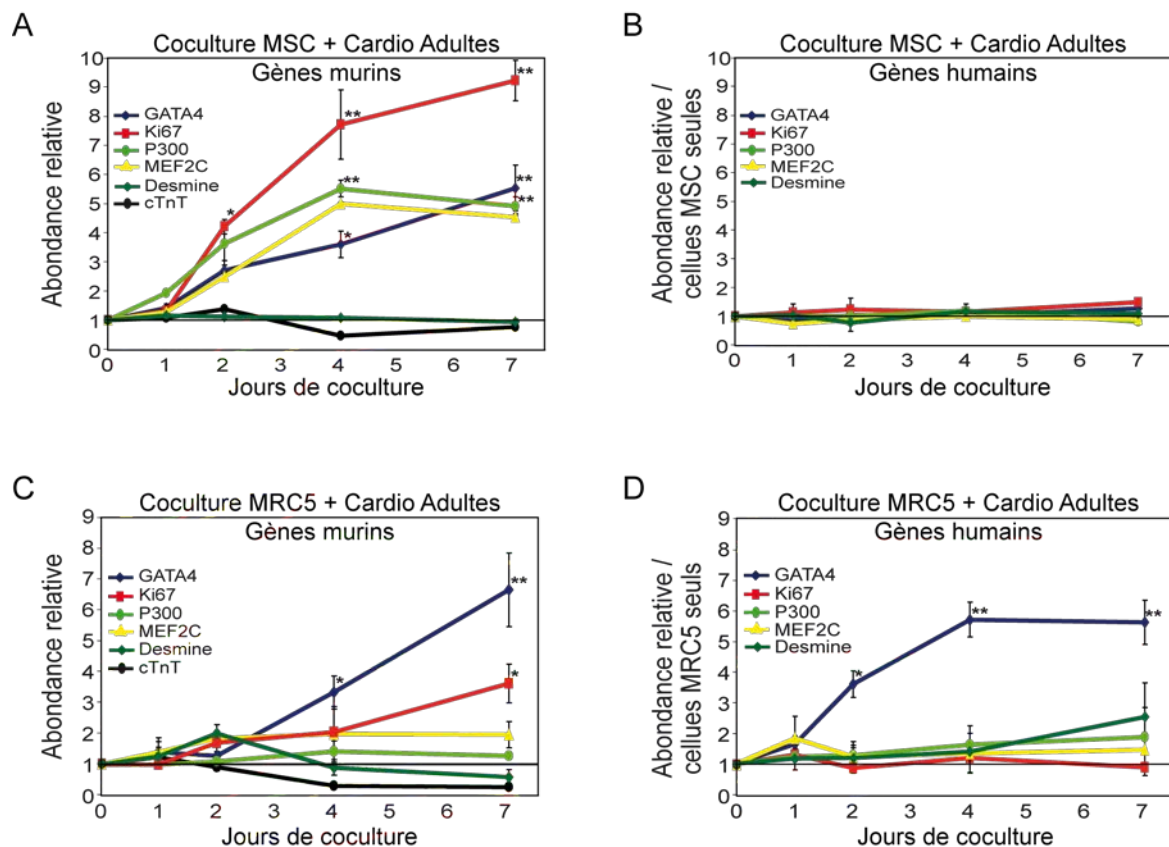


Figure 35. Comparaison du potentiel de reprogrammation de différents types cellulaires par qRT-PCR. (A-D) Mesure de l'expression des gènes cardiaques murins (A, C) et humains (B, D) au cours d'une coculture de J0 à J7 entre des cardiomyocytes et des cellules souches de la moelle osseuse (A, B) ou des fibroblastes (C, D). Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types à partir d'au moins trois expériences indépendantes. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

3. Modulation de la reprogrammation des cardiomyocytes

3.1. Importance du cycle cellulaire des cellules hMADS dans la reprogrammation des cardiomyocytes

Dans les modèles de reprogrammation par transfert nucléaire, le noyau transféré a été rapporté comme pouvant être reprogrammé uniquement si le cytoplasme du zygote énucléé était en phase de division cellulaire (Egli *et al.* 2008). A la lumière de ces résultats, nous avons cherché à savoir si le statut du cycle des cellules hMADS est un facteur pouvant influencer le taux de reprogrammation cardiomyogénique murin. Les cellules hMADS ont été arrêtées ou synchronisées dans différentes phases de leur cycle par des traitements physiques ou chimiques. La croissance cellulaire des cellules hMADS a été stoppée par une irradiation gamma de 100 grays, la synchronisation en phase G1 a été menée par traitement à l'aphidicoline et la synchronisation en phase G2/M a été assurée par traitement au nocodazole. Les effets des traitements sur le cycle cellulaire des cellules hMADS ont été mesurés par cytométrie en flux et la capacité de reprogrammation a été évaluée par qRT-PCR (Figure 36). Alors que l'aphidicoline et le nocodazole n'ont pas montré d'effets par rapport au contrôle (Figure 36A-D), l'irradiation gamma des cellules hMADS se traduit par une augmentation plus rapide de l'expression transcriptionnelle de GATA-4 murin dès J2 avec un pic à J4 et une abondance relative de 7 contre 3,9 pour le contrôle (Figure 36F). Cependant l'accélération du phénomène de reprogrammation ne perdure pas et le niveau de transcription de ce gène rejoint celui du contrôle à J7 avec des abondances relatives respectivement de 6,3 et 6. Toutefois, l'effet de l'irradiation des cellules hMADS sur la reprogrammation ne semble pas lié à l'arrêt du cycle cellulaire comme en témoigne l'analyse du cycle des cellules irradiées par cytométrie en flux (Figure 36E).

Ces résultats sur le cycle cellulaire nous ont indiqué que la reprogrammation médiée par les cellules souches était indépendante de leur position dans le cycle et qu'elle pouvait avoir lieu lorsque les cellules hMADS étaient en phase de synthèse d'ADN ou de mitose.

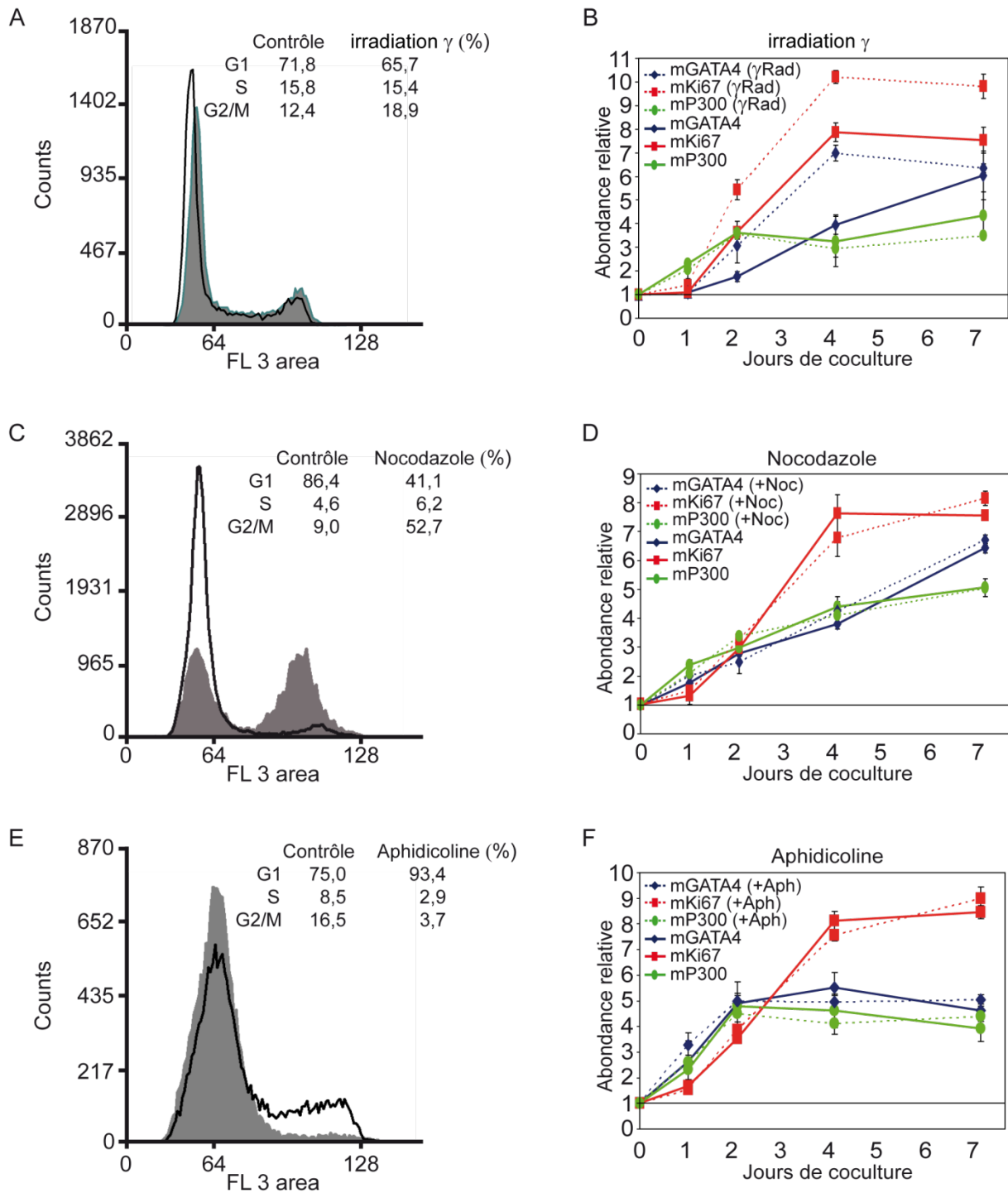


Figure 36. Impact du cycle cellulaire sur l'efficacité de reprogrammation mesurée par qRT-PCR. (A, C, E) Les effets des traitements utilisés ont été confirmés par cytométrie en flux (courbes grises). Les pourcentages de cellules dans chaque phase du cycle sont indiqués. Les courbes en trait plein représentent les cellules hMADS non traitées. (B, D, F) Mesures par qRT-PCR de l'expression des gènes cardiaques après traitement (pointillés) et en condition contrôle (trait plein). Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types.

3.2. Stade de développement des cardiomyocytes et reprogrammation nucléaire

De nombreuses études utilisent le modèle de coculture entre cellules souches et cardiomyocytes pour investiguer les capacités de transdifférenciation cardiaque des cellules souches, notamment des CSM (Nishiyama *et al.* 2007; Wang *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2005a). La plupart des études publiées sur les cocultures utilisent comme modèle de cellules cardiaques, des cardiomyocytes fœtaux ou néonataux. Ces cellules possèdent des caractéristiques différentes des cardiomyocytes adultes. En effet, elles sont capables d'adhérer à une surface de culture non coatée, se mettent spontanément à battre 24 heures après leur isolement et sont capables de proliférer, bien que cette capacité soit de courte durée en culture (Dhein *et al.* 2005).

Nous avons décidé d'utiliser des cardiomyocytes néonataux en coculture avec des cellules hMADS pour déterminer (i) si le stade développemental des cardiomyocytes pouvait influencer la reprogrammation médiée par les cellules hMADS, (ii) si les cellules hMADS, à l'instar de ce qui est trouvé dans la littérature, ont suivi un mécanisme de transdifférenciation selon la voie cardiomyogénique. Nous avons donc réalisé des cocultures avec des cardiomyocytes néonataux murins et avons analysé l'expression des gènes cardiaques précoces et tardifs d'origine murine et humaine, par qRT-PCR. Nous n'avons pas remarqué d'augmentation significative de l'activité transcriptionnelle des gènes cardiaques murins, qu'ils soient précoces ou tardifs (Figure 37A) de même qu'aucune transdifférenciation des cellules souches humaines n'a pu être mesurée à l'aide de cette technique (Figure 37B). En conclusion, l'utilisation de cardiomyocytes néonataux dans les cocultures avec les cellules hMADS dans nos conditions n'induit ni la transdifférenciation cardiaque des cellules souches ni une reprogrammation vers un stade de progéniteur cardiaque suggérant que l'état post-mitotique du cardiomyocyte est un élément important pour sa reprogrammation.

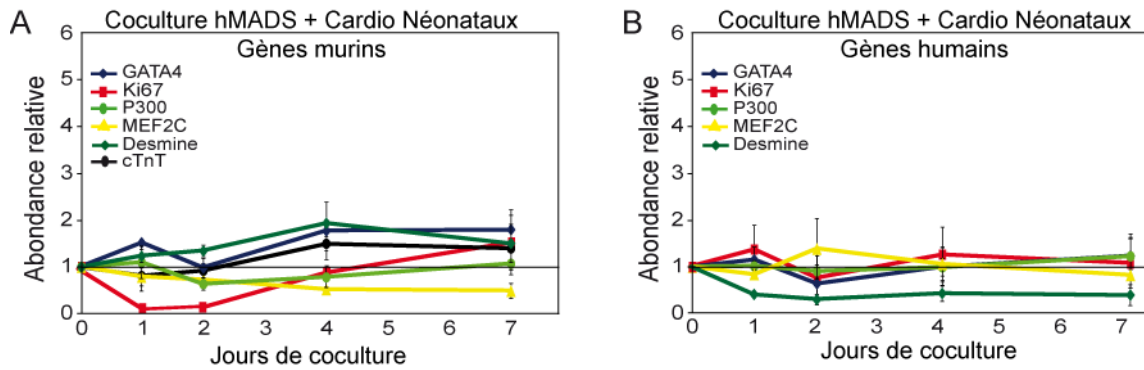


Figure 37. Effet du stade de développement des cardiomyocytes sur la reprogrammation mesurée par qRT-PCR. Evolution de l'expression des gènes cardiaques et de prolifération murins (A) et humains (B) au cours de la coculture entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins néonataux de J0 à J7. Les données sont représentées sous forme de moyennes \pm écarts types.

4. Extension de la reprogrammation à un autre type de cellules somatiques d'intérêt thérapeutique

Dans une dernière partie de mon travail, j'ai essayé brièvement de déterminer si la capacité de reprogrammation d'un noyau somatique des cellules hMADS par une approche de coculture avec des cardiomyocytes pouvait être transposé à un autre type de cellules considérées comme post-mitotiques et présentant un intérêt thérapeutique. Nous avons choisi les neurones sensitifs du système nerveux périphérique présents dans les ganglions rachidiens postérieurs de souris adultes. La première étape a consisté à vérifier la possibilité d'échanges entre les cellules hMADS et les neurones rachidiens. Le même type de marquages que ceux réalisés avec les cardiomyocytes adultes ont été réalisés, à savoir du Q525 pour les cellules hMADS et du CM-Dil pour les neurones adultes. Nous avons pu mettre en évidence des cellules hybrides dès 24 heures de coculture (Figure 38).

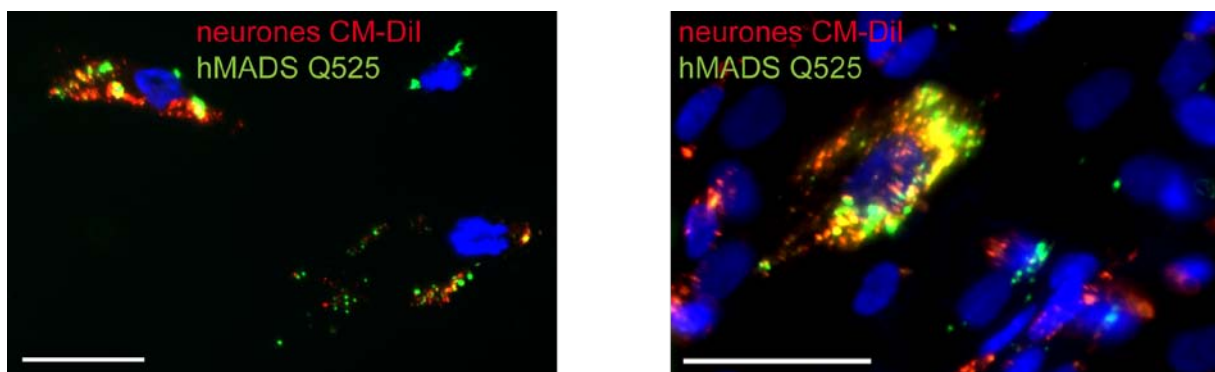


Figure 38. Echanges de matériel cytoplasmique entre les cellules hMADS et les neurones adultes de ganglions rachidiens 24 heures après l'initiation de la coculture. Présence de cellules hybrides contenant du matériel cytoplasmique humain (Q525, vert) et murin (CM-Dil, rouge). Barres d'échelle : 50 μ m.

Une fois isolés, les neurones cultivés seuls ont montré la capacité d'étendre leurs corps cellulaires sous la forme d'un réseau de neurites (marquage β -III tubuline) mais à aucun moment nous n'avons pu détecter des cellules β -III tubuline⁺ dont les noyaux ont exprimé le marqueur de prolifération Ki67 (Figure 39).

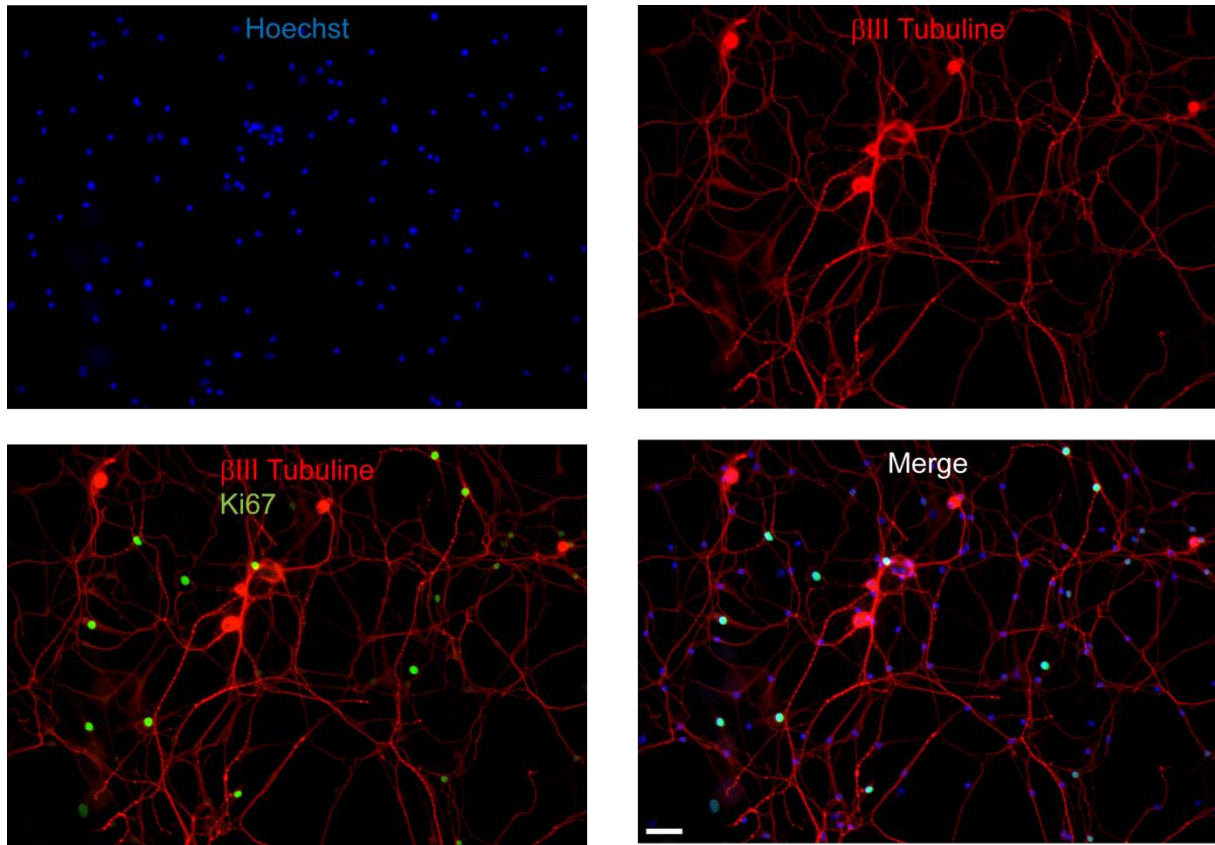


Figure 39. Les neurones de ganglions rachidiens adultes seuls n'expriment pas Ki67. Immunomarquage de la β -III tubuline (Cy-3, rouge) et de Ki67 (FITC, vert) sur une culture de neurones de ganglions rachidiens. Les cellules exprimant la β -III tubuline sont négatives pour Ki67. Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barre d'échelle : 50 μ m.

En revanche lors d'une coculture avec des cellules hMADS, des cellules ont exprimé de façon concomitante la β -III tubuline et le marqueur de prolifération Ki67 (Figure 40). Ces cellules, morphologiquement différentes des neurones et des cellules souches, ont été détectées après 8 jours de coculture soit de manière isolée (Figure 40A, B) soit sous forme de colonies dont les prolongements étaient orientés dans le même sens (Figure 40C). L'ensemble de ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que les cellules hMADS sont capables de reprogrammer vers un stade plus immature des cellules post-mitotiques autres que des cardiomyocytes et notamment des neurones ganglionnaires.

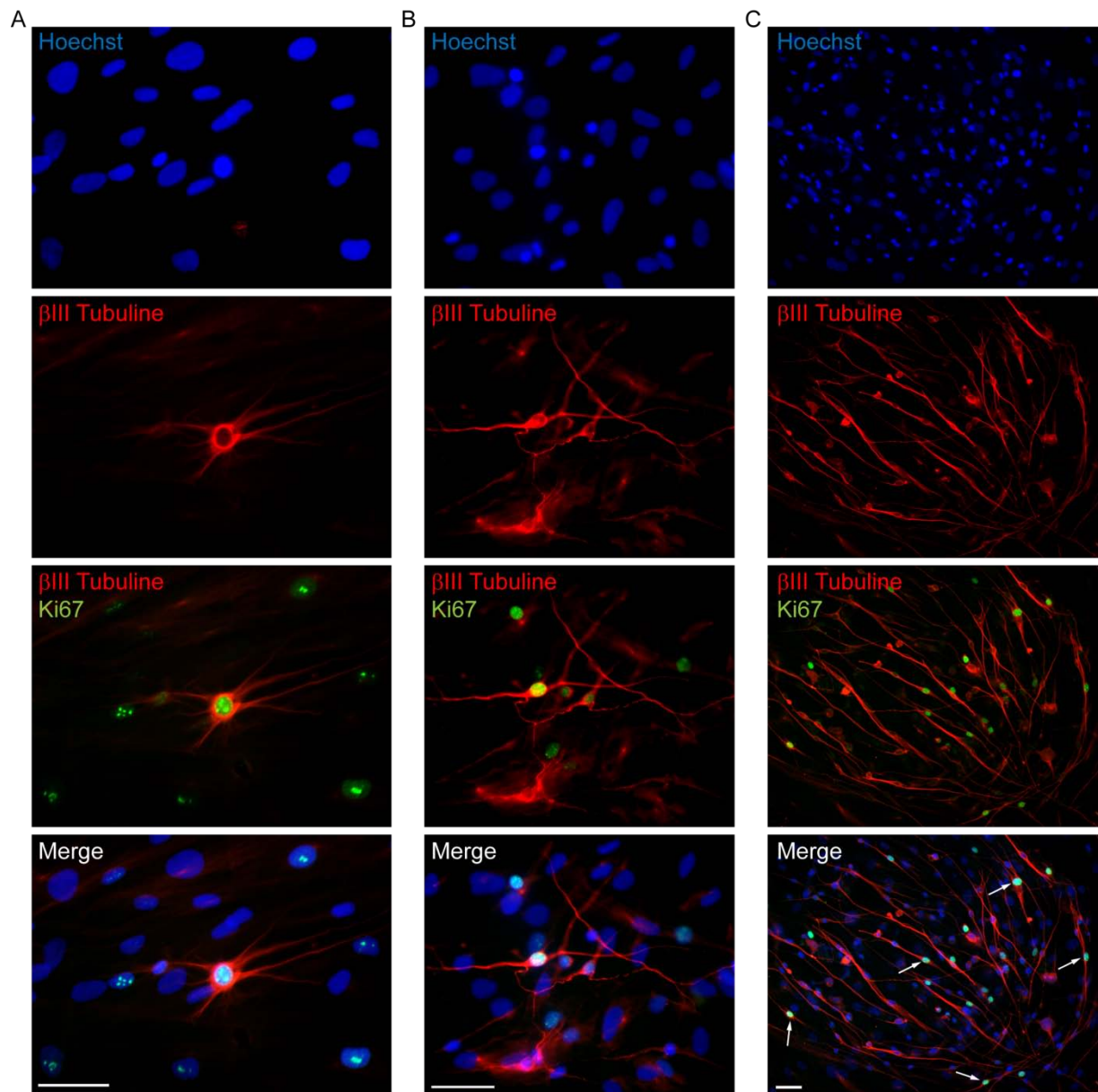


Figure 40. La coculture entre les cellules hMADS et les neurones de ganglions rachidiens induit l'apparition de cellules β -III tubuline / Ki67 double positives. Immunomarquage de la β -III tubuline (Cy-3,rouge) et de Ki67 (FITC, vert) sur une coculture de 8 jours. Les cellules doubles positives ont été détectées soit de manière isolée (**A**, **B**) soit en colonies (flèches) (**C**). Les noyaux ont été contre colorés au Hoechst 33342 (bleu) ; barres d'échelle : 50 μ m.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'utilisation des cellules souches adultes mésenchymateuses en thérapie cellulaire et notamment cardiaque semble prometteuse. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les cellules souches contribuent à la régénération myocardique restent encore confus. L'ensemble des résultats dans la littérature s'accorde sur le fait que les effets bénéfiques des CSM constatés *in vivo* ne sont pas dus à une différenciation de celles-ci en cardiomyocytes (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Nygren *et al.* 2004; Terada *et al.* 2002). De plus certains travaux ont rapporté l'existence d'évènements de fusion cellulaire accompagnée de fusion nucléaire *in vivo* (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Payne *et al.* 2005). Néanmoins l'extrême rareté de ces évènements a provoqué une polémique sur le rôle réel de ce phénomène en tant que mécanisme de régénération.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif de mieux évaluer la fusion cellulaire entre les cellules souches adultes et les cardiomyocytes et de caractériser les cellules hybrides résultant de cette fusion afin de mieux comprendre la signification biologique de ce phénomène. Grâce à une approche de coculture *in vitro* entre des cellules souches adultes dérivées du tissu adipeux humain et des cardiomyocytes murins post-mitotiques, nous avons notamment pu montrer que les évènements fusionnels permettent la reprogrammation des noyaux post-mitotiques murins vers un stade progéniteur. De plus, contrairement aux hypothèses précédemment formulées, les évènements de fusion survenant entre cellules souches et cardiomyocytes impliqués dans cette reprogrammation somatique sont des évènements de fusion partielle impliquant des structures nanotubulaires permettant le transfert de mitochondries fonctionnelles de la cellule souche vers le cardiomyocyte.

Notre étude montre que la fréquence du phénomène de reprogrammation par fusion partielle reste faible, même si elle a été en partie optimisée par l'approche *in vitro*. Ce taux de reprogrammation est sans doute sous-estimé par la faible viabilité des cardiomyocytes qui est liée à l'étape de dissociation et à nos conditions de culture. Il reste donc à déterminer si l'utilisation d'un milieu de culture mieux adapté aux cardiomyocytes permettrait de prolonger dans le temps la survenue des évènements fusionnels entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes ce qui augmenterait leur taux de reprogrammation. L'utilisation de boîtes coatées reproduisant une matrice extracellulaire (à base de laminine et/ou de fibronectine) et d'un milieu additionné d'un cocktail contenant par exemple de

l'insuline, de la transferrine et du sélénium (ITS) devraient permettre de répondre à cette question (Sambrano *et al.* 2002).

Nous avons caractérisé d'un point de vue phénotypique des cellules hybrides cardiaques issues de la fusion entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes adultes. Ces cellules hybrides, expriment des facteurs de transcription cardiomyogéniques précoces tels que GATA-4 et MEF-2C ainsi que le marqueur de prolifération Ki67. Cependant, elles n'expriment pas de marqueurs cardiomyogéniques tardifs impliqués dans la contraction musculaire. Ces éléments font penser à un phénotype intermédiaire entre des cellules souches et des cellules complètement différenciées conférant aux hybrides des caractéristiques de progéniteurs cardiaques.

Ce phénotype révélé par immunocytochimie a été confirmé par qRT-PCR avec l'activation de l'expression des gènes cardiomyogéniques précoces et de prolifération exclusivement murins et l'absence d'activation des gènes cardiaques humains. Les expériences de coculture entre des cellules souches et des cardiomyocytes GFP positifs ont abouti à la caractérisation de cellules murines exprimant à la fois le marqueur GATA-4 et la GFP et une analyse immunocytochimique de la Lamine A/C présente dans les cellules hybrides a permis de mettre en évidence que cette protéine nucléaire était bien d'origine murine. L'hypothèse d'une transdifférenciation des cellules hMADS vers la voie cardiomyogénique humaine a donc été exclue. Ce résultat est discordant avec un ensemble de travaux décrivant la transdifférenciation cardiaque comme mécanisme prépondérant lors d'une coculture entre des cardiomyocytes et des CSM (Nishiyama *et al.* 2007; Yoon *et al.* 2005a). Toutefois, ces modèles de coculture aboutissant à une transdifférenciation sont basés sur l'emploi de cardiomyocytes fœtaux (Nishiyama *et al.* 2007) ou néonataux (Yoon *et al.* 2005a) qui possèdent des caractéristiques différentes des cardiomyocytes adultes. Ces cellules sont capables d'adhérer à une surface de culture non coatée, se mettent spontanément à battre 24 heures après leur isolement et présentent une courte phase de prolifération (Dhein *et al.* 2005). Les divergences avec notre modèle de coculture ne concernent pas que les cardiomyocytes, puisque les sources de CSM sont également différentes. Les CSM de sang de cordon utilisées par Nishiyama *et al.* (Nishiyama *et al.* 2007) ont montré une synchronisation électromécanique avec les cardiomyocytes néonataux par l'expression de la connexine 43 ainsi que l'expression de la troponine cardiaque I. De plus, les auteurs ont exclu le phénomène de fusion comme étant responsable de ce nouveau phénotype. Dans le modèle de coculture mettant en jeu des CSM de MO de Yoon *et al.* (Yoon *et al.* 2005a) la fusion cellulaire n'a pas été étudiée en détails et seul le contact cellule-cellule a été décrit comme indispensable. Dans cette étude, environ 10% des CSM de MO cocultivées avec des cardiomyocytes néonataux ont

exprimé le marqueur de différenciation cardiaque α -actinine sarcomérique alors que dans une coculture entre ces CSM et des cardiomyocytes adultes, aucun processus de transdifférenciation n'a été observé.

Une question importante soulevée par notre travail est de caractériser le degré de similitude des progéniteurs cardiaques hybrides dérivés des cocultures avec les cellules souches cardiaques résidentes (Beltrami *et al.* 2003; Dawn *et al.* 2005; Messina *et al.* 2004; Oh *et al.* 2003). Il serait notamment intéressant d'analyser dans les progéniteurs hybrides l'expression des marqueurs très précoces tels que c-kit, Lin ou Sca-1 que l'on retrouve dans cellules souches cardiaques ainsi que les capacités de différenciation de ces cellules en cardiomyocytes battants. Cette différenciation terminale n'a pas été observée dans nos conditions expérimentales. Néanmoins nous ne pouvons pas exclure qu'avec des conditions de différenciation favorables, comme par exemple un milieu reproduisant le microenvironnement cardiaque, ce phénomène puisse avoir lieu. Ces milieux de différenciation cardiaque pour cellules souches adultes sont à ce jour très difficiles à concevoir et contiennent pour la plupart de la 5-azacytidine (Porat *et al.* 2006), agent déméthylant de l'ADN et dont la spécificité pour la voie cardiomyogénique n'a pas été démontrée. C'est pourquoi le laboratoire a étudié la différenciation *in vivo* des progéniteurs issus de cocultures avec des cardiomyocytes murins GFP⁺ après transplantation dans un modèle d'ischémie chez le petit animal. Ces travaux ont montré des cardiomyocytes adultes GFP⁺ dans le myocarde de souris C57Bl6J prouvant ainsi que les progéniteurs hybrides GFP⁺ issus des cocultures sont capables de se différencier en cardiomyocytes fonctionnels *in vivo*.

Nos travaux montrent également qu'à côté des événements de fusion partielle, se produisent des événements de fusion permanente. Cependant, nous n'avons pas détecté la présence d'hétérokaryons dans les cocultures et le nombre de synkaryons s'est révélé très faible. A aucun moment nous n'avons pu mettre en évidence des synkaryons exprimant le marqueur cardiomyogénique précoce GATA-4. Toutes ces données suggèrent le rôle peu probable de la fusion permanente dans la génération des hybrides cardiaques. Néanmoins, le rôle de cette fusion, même s'il est marginal, reste à déterminer. Nous avons également pu mettre en évidence des échanges entre les cellules souches et les cardiomyocytes dès 6 heures de coculture. Les transferts cytoplasmiques et nucléaires ont été observés des cardiomyocytes vers les cellules hMADS alors que pour les mitochondries, ils ont été bidirectionnels. De plus, nous avons montré que ces échanges précoces ne sont pas la conséquence de la diffusion de matériel via le milieu extracellulaire, mais bien le résultat d'un processus de transfert. Ces échanges entre cellules souches et cardiomyocytes ont

antérieurement été observés *in vitro* dans les mêmes délais, à savoir entre 4 heures et 24 heures de coculture et témoignent d'une fusion partielle (Cselenyak *et al.* 2010; Koyanagi *et al.* 2005; Plotnikov *et al.* 2008). Cependant, ces études présentent plusieurs différences. Cselenyak *et al.* et Koyanagi *et al.* décrivent des transferts unilatéraux de mitochondries alors que Plotnikov *et al.* rapportent comme nous des transferts bilatéraux. En outre, ces études ont suggéré que ces échanges étaient à la base de l'initiation de la transdifférenciation des cellules souches cocultivées, même si la caractérisation de la différenciation cardiaque est restée très partielle. Ces différences viennent probablement des modèles mis en jeu. Cselenyak *et al.* ont utilisé des cardiomyoblastes de la lignée H9c2 cultivés en hypoxie et privés de glucose pendant 150 minutes avant la coculture avec des CSM de MO. Plotnikov *et al.* ont employé le même modèle de cellules souches mais cocultivées avec des cardiomyocytes fœtaux. Enfin, dans les travaux de Koyanagi *et al.*, les cellules souches sont des progéniteurs endothéliaux cocultivés avec des cardiomyocytes néonataux alors que nous avons utilisé des cardiomyocytes adultes en normoxie en présence de cellules hMADS dérivées du tissu adipeux.

Malgré ces différences dans la direction des transferts mitochondriaux et de différenciation des CSM, ces études ainsi que nos observations ont montré en plus de l'existence de contacts étroits cellule-cellule, la présence de fins prolongements membranaires faisant penser à des structures de communications intercellulaires appelées nanotubes (Cselenyak *et al.* 2010; Plotnikov *et al.* 2008). Les nanotubes, présents chez de nombreuses cellules animales, représentent un moyen privilégié pour le transfert sur de longues distances de grosses molécules comme des récepteurs membranaires, des vésicules intracellulaires ou encore des organites (Rustom *et al.* 2004). Ces données de la littérature associées à nos observations de nanotubes, de contacts cellule-cellule et d'échanges de matériel cytoplasmique et nucléaire nous ont permis d'avancer la possibilité d'un phénomène de fusion partielle pour expliquer l'apparition des cellules hybrides au sein des cocultures. Cette hypothèse s'est vue confirmer par la réalisation d'une coculture en présence d'une membrane semi-perméable inhibant les contacts cellulaires et les échanges mais pas la diffusion de facteurs solubles. Dans ces conditions, aucune activation des gènes cardiomyogéniques précoces murins n'a été observée par qRT-PCR. En conséquences, le contact cellulaire, qu'il soit étroit ou distant, permet les échanges cellulaires observés et est indispensable à la reprogrammation des cardiomyocytes après fusion partielle.

Pour compléter l'étude sur les échanges intercellulaires et la reprogrammation, la composition ainsi que l'importance des nanotubes dans ce phénomène ont été étudiées. Plusieurs types de nanotubes ont été décrits, en fonction de leur diamètre et de leur composition (Onfelt *et al.* 2006). Il a été montré que les nanotubes dont le diamètre est le

plus petit sont composés uniquement de f-actine alors que les plus gros, sont constitués à la fois de f-actine et de microfilaments de tubuline. Cette deuxième catégorie de nanotubes a été mise en évidence dans le transport de vésicules et d'organites, notamment lors du transfert de mitochondries *in vitro* entre macrophages (Onfelt *et al.* 2006). Dans les conditions de notre étude, nous avons pu déterminer qu'à la fois la f-actine et l' α -tubuline entraient dans la composition des nanotubes, suggérant que les transferts de mitochondries observés durant la coculture pourraient intervenir via ces structures.

L'utilisation de cytochalasin D, de latrunculine A et de nocodazole, pour inhiber respectivement la polymérisation des filaments d'actine et de tubuline, a permis de mettre en évidence le rôle de ces structures dans la reprogrammation des cardiomyocytes. Les résultats suggèrent qu'en absence de fusion partielle médiée par les nanotubes, la reprogrammation des cardiomyocytes ne peut avoir lieu. En parallèle et de façon intéressante, nos résultats suggèrent également qu'en présence de ces drogues et donc de l'inhibition des mécanismes de fusion partielle, les cellules hMADS entament un processus de transdifférenciation cardiaque. Ce phénomène semble être une réponse alternative en absence de fusion. Néanmoins ce processus de transdifférenciation cardiaque n'est que partiel et son rôle en tant que mécanisme de régénération reste à déterminer.

Les nanotubes, dont l'existence a été démontrée *in vitro* dans des lignées cellulaires ou dans des cellules fraîchement isolées, (Gerdes *et al.* 2007; Onfelt *et al.* 2006; Rustom *et al.* 2004), ont pris une nouvelle dimension après la découverte de leur présence *in vivo*, dans la cornée de souris (Chinnery *et al.* 2008). La mise en évidence de ces structures a été possible grâce aux propriétés de la cornée, un tissu rigide, transparent et avasculaire. Ce résultat signifie que dans les autres tissus, la présence de nanotubes a pu être masquée par les propriétés physiques et biologiques des tissus considérés qui rendent la détection de ces structures extrêmement difficile. Ce résultat est d'autant plus intéressant que le nombre et la longueur de ces nanotubes ont augmentés lors d'une inflammation de la cornée. Ces données sont à rapprocher du contexte inflammatoire que l'on retrouve dans le myocarde à la suite d'un infarctus et qui pourrait représenter le meilleur moment pour injecter des cellules souches, des progéniteurs ou un mélange des deux.

La donnée la plus importante de cette étude, révélée pour la première fois, est que les mitochondries humaines ont été retrouvées dans les progéniteurs cardiaques murins et qu'en l'absence d'un transfert de ces mitochondries, la reprogrammation des cardiomyocytes est significativement inhibée. Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence par microscopie confocale le transfert des mitochondries par les nanotubes, de la cellule hMADS vers les cardiomyocytes adultes. Puis ces mitochondries humaines ont été

montrées comme persistantes dans des progéniteurs cardiaques murins hybrides exprimant GATA-4 et la β -galactosidase issus de la fusion entre des cardiomyocytes ROSA26R et des cellules hMADS-Cre⁺. L'importance de leur rôle dans la reprogrammation a été démontrée par une coculture entre des cardiomyocytes adultes et des cellules hMADS déplétées en mitochondries après un traitement chronique au BET. Dans ces conditions, la capacité de fusion des cellules hMADS n'a pas été altérée mais la quantité de progéniteurs et la fréquence de reprogrammation ont été fortement diminuées.

Le rôle exact des mitochondries des cellules souches dans la reprogrammation cardiomyogénique reste à définir. Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être émises pour expliquer à quel niveau ces organites agissent. Tout d'abord, le transfert de mitochondries humaines en direction du cardiomyocyte en souffrance pourrait favoriser la survie des cellules murines ce qui dans un second temps permettrait la reprogrammation de ce dernier vers le stade de progéniteur. En effet lors de l'hypoxie, les mitochondries cardiaques sont sujettes à plusieurs phénomènes (ouverture du pore mitochondrial, autophagie) qui conduisent à la mort du cardiomyocyte, c'est pourquoi le transfert de mitochondries fonctionnelles pourrait lui permettre de survivre, ou en tous cas, de prolonger sa survie. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de Spees *et al.* (Spees *et al.* 2006) qui a montré que des cellules A549 p0 déplétées en mitochondries et mises en coculture avec des cellules souches sont capables de récupérer des mitochondries fonctionnelles permettant un rétablissement de leur respiration cellulaire. Néanmoins, il reste à élucider si les mitochondries participent directement à la reprogrammation nucléaire et si oui, par quel mécanisme. Une des pistes à explorer concerne les voies de signalisation rétrogrades. En effet, la mitochondrie, en plus d'assurer la phosphorylation oxydative à l'intérieur d'une cellule eucaryote, communique avec le noyau et est capable d'orienter et de réguler la transcription de nombreux gènes nucléaires (Liu et Butow 2006). Ces signaux rétrogrades sont mal connus chez les eucaryotes supérieurs et les molécules impliquées ne sont, pour la plupart, pas encore identifiées. Néanmoins ces signaux semblent impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme le métabolisme, le cycle et la prolifération cellulaires (Erol 2005). On peut également imaginer que les mitochondries ont uniquement un rôle dans la survie des cardiomyocytes et que le transfert concomitant d'autres molécules telles que des facteurs de transcription permettent la reprogrammation directe du noyau.

Pour résumer de façon chronologique les événements, les échanges intercellulaires et notamment le transfert de mitochondries ont été mis en évidence dès 6 heures après le début de la coculture entre les cellules hMADS et les cardiomyocytes murins adultes mais il est raisonnable de penser qu'ils ont débuté dès l'initiation de la coculture. Après 48 heures,

les premières cellules hybrides contenant des mitochondries humaines ont été détectées et expriment les marqueurs cardiomyogéniques précoces GATA-4, NKX2.5, MEF-2C et le marqueur de prolifération Ki67. Puis la reprogrammation s'achève et les progéniteurs cardiaques hybrides se multiplient jusqu'à au moins J14.

Un point important soulevé par notre étude est que le potentiel de reprogrammation cardiomyogénique ne semble pas être une caractéristique restreinte aux cellules hMADS. En effet, nous avons pu montrer que d'autres types de cellules souches mésenchymateuses, des CSM dérivées de la moelle osseuse, sont capables de reprogrammer les cardiomyocytes de façon similaire aux cellules hMADS. Néanmoins il est nécessaire de préciser que seuls les passages précoces des CSM de moelle osseuse permettent une reprogrammation des cardiomyocytes, les passages tardifs se sont révélés inefficaces. Cette perte de la capacité à reprogrammer au passage tardif est à relier à la perte de plasticité des CSM. De plus, nous avons pu montrer que des fibroblastes humains, bien qu'étant capables de proliférer mais dépourvus de plasticité cellulaire sont incapables de reprogrammer les cardiomyocytes vers un stade progéniteur. L'ensemble de ces résultats suggèrent que cette capacité à reprogrammer est liée non pas à l'état prolifératif des cellules mais à leur multipotentialité. En effet, les cellules hMADS peuvent être considérées comme plus immatures que les CSM de la MO puisqu'elles ont des capacités d'auto-renouvellement plus importantes et une activité télomérase (Rodriguez *et al.* 2005b). Pour confirmer davantage cette hypothèse, il serait particulièrement intéressant d'analyser les capacités de reprogrammation de cellules souches plus immatures, i.e. pluripotentes, telles que les cellules ES ou les iPS.

La deuxième partie de notre étude a eu pour objectif de mieux comprendre les facteurs permettant d'influencer le taux de reprogrammation afin d'augmenter l'incidence de ce dernier.

Nous avons tout d'abord analysé si l'état du cycle cellulaire des cellules hMADS pouvait influencer sur l'efficacité de reprogrammation des cardiomyocytes. L'avancement dans le cycle cellulaire des cellules hMADS a été étudié suite aux résultats soulignant l'importance de la phase du cycle dans laquelle doit se trouver le cytoplasme receveur afin de faciliter la reprogrammation du noyau transféré lors d'expériences de transfert nucléaire (Egli *et al.* 2007; Gao *et al.* 2002). En effet, l'expression du programme embryonnaire du noyau transféré est possible uniquement dans un cytoplasme mitotique contenant les facteurs de transcription indispensables à l'expression de ce programme. Nous avons testé trois configurations. Des cellules hMADS bloquées en phase G1, en phase

G2/M ou bien gamma-irradiées afin de stopper leur prolifération. L'aphidicoline et le nocodazole, utilisés pour synchroniser les cellules respectivement en phase G1 et en phase G2/M n'ont pas modifié le potentiel de reprogrammation des cellules hMADS suggérant que l'avancement dans le cycle n'était pas un facteur déterminant pour la reprogrammation des cardiomyocytes. Concernant les effets de l'irradiation, les résultats sont plus surprenants. Nous avons assisté à une activation plus importante de l'expression de GATA-4 et de Ki67 murins alors que les résultats de cytométrie montrent que l'irradiation des cellules hMADS n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, y compris à des doses de 100 grays, suggérant que l'effet de l'irradiation sur la reprogrammation n'est pas en relation avec l'état de prolifération des cellules hMADS. Nos résultats sur l'absence d'effet de l'irradiation sur la prolifération sont en accord avec d'autres travaux sur les cellules souches montrant qu'elles sont plus résistantes aux irradiations que les cellules somatiques (Hambardzumyan *et al.* 2006). Cette résistance à l'irradiation est sans doute un mécanisme adaptatif des cellules souches qui doivent générer un grand nombre de cellules différenciées avec un génome exempt de mutations. Les effets que nous avons constatés sur la reprogrammation pourraient donc être en relation avec un mécanisme de protection cellulaire des cellules hMADS face au stress génotoxique de l'irradiation et/ou à un accroissement de la sécrétion de facteurs qui permettraient aux cellules hMADS de survivre et qui après transfert dans le cardiomyocyte, pourraient augmenter sa viabilité et donc sa reprogrammation. Néanmoins, la caractérisation de tels facteurs reste à effectuer. De façon intéressante, des études récentes ont montré que l'irradiation a permis d'augmenter les événements de fusion dans plusieurs modèles (Espejel *et al.* 2009; Nygren *et al.* 2008). Dans ces travaux, les auteurs avancent l'hypothèse que l'irradiation provoque une réaction inflammatoire locale dans les organes irradiés, ce qui favoriserait la fusion des cellules souches dérivées de moelle osseuse avec les cellules du receveur, notamment dans le foie, le cœur et le cervelet.

Classiquement, les systèmes de coculture avec des cardiomyocytes fœtaux ou néonataux sont utilisés pour étudier la capacité de transdifférenciation des CSM en cellules cardiaques (Nishiyama *et al.* 2007; Yoon *et al.* 2005a), les milieux conditionnés permettant l'induction d'une telle différenciation étant encore mal décrits dans la littérature. Néanmoins, ces études sont hétérogènes et certains travaux ont du mal à démontrer une réelle transdifférenciation des CSM (Koninckx *et al.* 2009; Roura *et al.* 2010). D'autre part, la plupart des cocultures sont réalisées intra-espèce, donc ce qui est interprété comme une transdifférenciation cardiaque des cellules souches peut être en réalité la conséquence d'un phénomène de reprogrammation. En accord avec cette hypothèse, l'analyse de la transdifférenciation cardiaque des cellules souches demeure quelques fois très partielle (analyse de l'expression de quelques marqueurs, sans quantification) et peu

d'évidences existent dans la littérature sur la possibilité d'obtenir des cardiomyocytes battants et fonctionnels à partir de cellules souches différenciées.

L'utilisation d'un dispositif expérimental consistant à cocultiver des cellules hMADS avec des cardiomyocytes néonataux doit nous permettre de répondre à deux questions : (i) le stade développemental des cardiomyocytes est-il susceptible d'augmenter le potentiel de reprogrammation par les cellules hMADS et (ii) l'absence de transdifférenciation des cellules hMADS est-elle due au fait que nos cocultures ont été réalisées avec des cardiomyocytes adultes ? Dans les cocultures réalisées avec des cardiomyocytes néonataux, nous n'avons pas détecté de transdifférenciation des cellules hMADS, ceci suggère que le potentiel de transdifférenciation de nos cellules ne résulte pas du stade développemental du cardiomyocyte utilisé pour la coculture (contrairement à ce qui avait été suggéré par une étude antérieure avec des CSM de MO qui avaient été décrites comme capables de se transdifférencier en présence de cardiomyocytes néonataux mais pas adultes (Yoon *et al.* 2005a)). Outre l'absence de transdifférenciation cardiaque des cellules hMADS cocultivées avec des cardiomyocytes néonataux, nous avons également constaté dans ce contexte une absence de reprogrammation des cellules cardiaques murines. Ces résultats suggèrent que la capacité des cellules souches à reprogrammer une autre cellule semble restreinte aux cellules post-mitotiques. Ce phénomène de reprogrammation peut permettre à la cellule somatique de ré-entrer dans le cycle cellulaire pour proliférer, ce qui lui confère un avantage sélectif avant de donner des progéniteurs. Le phénomène de dédifférenciation des cardiomyocytes adultes a déjà été remarqué au cours de cocultures en présence de fibroblastes cardiaques. Ces derniers, après contact cellule-cellule avec les cardiomyocytes, entraînent la perte d'expression des gènes cardiaques au profit d'une dédifférenciation des cardiomyocytes adultes (Dispersyn *et al.* 2001) suivie d'une réentrée dans le cycle cellulaire (Zaglia *et al.* 2009). Cependant aucune de ces deux études n'a mis en évidence la présence de progéniteurs comme nous avons pu le faire après coculture avec les cellules hMADS.

Le dernier point de ce travail a concerné la possibilité d'étendre la capacité de reprogrammation des cellules hMADS à d'autres types de cellules d'intérêt thérapeutique. Nous avons choisi des neurones sensoriels des ganglions rachidiens car bien que ces neurones soient capables de régénérer leurs dendrites après section (Geuna *et al.* 2009), ils sont considérés comme post-mitotiques et plus faciles à isoler que des neurones du système nerveux central, beaucoup plus sensibles à l'apoptose *in vitro*.

Les cocultures issues des cellules hMADS et des neurones sensitifs ont permis de mettre en évidence des échanges entre les deux types cellulaires en présence. Cependant on peut noter que le nombre de cellules hMADS contenant du matériel cytoplasmique murin a été moindre que lors des cocultures avec les cardiomyocytes. Après mise en culture des neurones seuls, aucune cellule ayant la morphologie typique des neurones ganglionnaires adultes, c'est-à-dire un gros corps cellulaire sphéroïde comportant des neurites plus ou moins longs s'étalant dans toutes les directions et positifs pour la β -III tubuline, n'a été trouvée positive pour le marqueur de prolifération Ki67. En revanche à la suite d'une coculture avec les cellules hMADS, des petites cellules isolées ou regroupées en colonies ont été détectées comme exprimant le marqueur neuronal de la β -III tubuline associé au marqueur de prolifération Ki67. De plus les corps cellulaires bipolaires des cellules rassemblées sous la forme d'une colonie sont orientés dans la même direction alors que les neurones ganglionnaires cultivés seuls ont présenté une croissance neuritique désorganisée. Cette observation soulève une interrogation sur la présence possible de cellules hMADS non fusionnées mais activées qui pourraient diriger la croissance des neurites par sécrétion d'un facteur trophique.

Ces résultats restent cependant incomplets et d'autres études sont nécessaires pour affiner ce travail, notamment pour découvrir si les mécanismes mis en jeu sont identiques à ceux impliqués dans la reprogrammation des cardiomyocytes. Il reste donc à déterminer quel mécanisme est à l'origine des résultats observés. S'agit-il d'une fusion cellulaire ou bien d'une transdifférenciation des cellules hMADS? S'il s'avère que la fusion est bien impliquée, nous devons établir si elle est partielle ou permanente, quel est le rôle éventuel des nanotubes dans cette fusion, en particulier ceux composés de f-actine et de microtubules, et si des mitochondries sont transférées par l'intermédiaire de ces structures. Enfin une caractérisation plus approfondie des cellules β -III tubuline⁺ / Ki67⁺ doit être entreprise ainsi que la possibilité d'obtenir ce type de cellules par coculture avec des cellules souches adultes d'une autre origine.

Toute l'étude présentée dans ce travail a été réalisée *in vitro* et même si elle a permis de mettre en évidence un mécanisme de fusion partielle et de caractériser les cellules hybrides qui en dérivent, il reste à déterminer si ce type de phénomène se produit *in vivo*, avec quelle fréquence et son impact en termes de régénération tissulaire. Peu d'études existent sur les mécanismes de fusion partielle via les nanotubes *in vivo* car très difficiles à mettre en œuvre techniquement. Néanmoins, la découverte de ces structures dans la cornée de souris et le fait que l'inflammation accroît leur fréquence (Chinnery *et al.* 2008), renforce l'idée de la fusion partielle comme un mécanisme important de

régénération médié par les cellules souches. De plus, des résultats préliminaires de scientifiques de l'université de Pittsburgh suggèrent, bien que non démontré, que les bénéfices observés après transplantation de cellules souches dans des cœurs infarctés humains pourraient venir du transfert de mitochondries dans les cardiomyocytes ischémiques après fusion avec les cellules transplantées (Mack 2006).

Outre l'apport de notre étude dans la connaissance des mécanismes de régénération, elle offre également des perspectives intéressantes dans l'optimisation des protocoles de thérapie cellulaire. En effet, des résultats au laboratoire montrent clairement que l'augmentation des phénomènes de fusion partielle par l'approche *in vitro* de coculture entre les cardiomyocytes et les cellules hMADS améliorent de façon significative le potentiel régénérateur des cellules souches dans un modèle d'ischémie cardiaque chez la souris qui se traduit par une amélioration des paramètres histologiques et fonctionnels cardiaques.

En parallèle, le laboratoire est en train de transférer les données obtenues sur le petit animal à un modèle préclinique d'ischémie-reperfusion chez le porc. Ce modèle de gros animal permet de reproduire une situation pathologique similaire à celle rencontrée chez l'humain. En outre, ce système permettra d'analyser les voies et les phases d'administration des cellules ainsi que la potentielle tumorigénicité des cellules transplantées. Des résultats préliminaires *in vitro* ont montré que la méthode de coculture entre des cellules hMADS et des cardiomyocytes adultes porcins a permis d'obtenir des cellules exprimant à la fois GATA-4 et Ki67.

L'ensemble de ces résultats valident la capacité de reprogrammation nucléaire des cellules hMADS et justifient la faisabilité de l'étude préclinique.

Enfin, les cellules cocultivées (tout comme les cellules hMADS seules) ont démontré leur propriété non immunogène *in vitro* en n'activant pas la prolifération de lymphocytes alloréactifs et *in vivo* par une absence d'infiltration lymphocytaire suite à l'injection des cocultures dans les cœurs ischémiés de souris et de porcs. Ces cellules, utilisées dans un contexte de coculture qui augmente leur potentiel régénérateur, représentent donc une alternative pour la thérapie cellulaire des organes post-mitotiques à faible pouvoir d'autorégénération et une utilisation allogénique peut être envisagée.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence le potentiel de reprogrammation d'une population de cellules souches adultes par coculture et fusion partielle avec des cellules somatiques. Ce processus a permis la réjuvenation de cardiomyocytes adultes vers un stade plus immature.

Dans notre modèle, nous avons observé une faible survie des cardiomyocytes due à la méthode d'isolement et aux conditions de culture défavorables. Compte tenu de l'absence de reprogrammation constatée dans les cocultures avec des cardiomyocytes néonataux, il reste à déterminer si les processus de fusion partielle et de reprogrammation sont dépendants de l'état de souffrance des cardiomyocytes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de reprogrammation, une étude du remodelage de la chromatine par immunoprécipitation pourrait être entreprise. De plus une analyse transcriptomique sur des cellules souches hMADS seules, des cardiomyocytes et des cocultures pourrait permettre d'analyser les gènes activés dans les cellules hMADS cocultivées et dans les cellules hybrides murines et permettrait d'identifier les facteurs (facteurs solubles ou facteurs de transcription) responsables de la reprogrammation des cardiomyocytes vers le stade progéniteur.

Les résultats découlant de ces approches pourraient permettre d'augmenter l'efficacité de reprogrammation, par exemple en prétraitant les cellules souches avec des agents responsables de modifications épigénétiques comme la trichostatine A ou la 5-azacytidine, respectivement une histone déacétylase et un agent déméthylant.

Enfin l'identification d'acteurs de la reprogrammation par l'approche de transcriptomique permettrait d'envisager une augmentation de l'efficacité de la reprogrammation soit en stimulant de façon exogène l'expression de ces facteurs par ajout de molécules solubles dans le milieu, soit en transfectant les cellules souches par des gènes candidats codant pour ces facteurs.

Lorsque nous avons comparé différentes populations de CSA, nous avons constaté que la capacité de reprogrammation était peut être liée à l'immaturité des cellules souches. Afin de confirmer cette hypothèse, les capacités de fusion et de reprogrammation des cellules souches embryonnaires et des iPS en présence de cardiomyocytes adultes seront également évaluées.

Ce système de coculture peut avoir également un intérêt thérapeutique en améliorant le potentiel cardiomyogénique des cellules hMADS. En effet, au laboratoire,

l'injection des cocultures contenant les cellules reprogrammées a démontré une amélioration fonctionnelle plus importante que l'injection des cellules souches seules dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le petit animal. Dans ce modèle, toute la coculture est injectée ce qui permet, en plus de l'effet thérapeutique des progéniteurs cardiaques, à des cellules souches de fusionner *in vivo* avec des cardiomyocytes résidents situés en bordure de la zone infarctée. Toutefois, la capacité de fusionner avec des cellules somatiques n'est pas le seul mécanisme de régénération mis en jeu par les CSA et il serait très intéressant d'évaluer les facteurs paracrines sécrétés par les cellules souches au contact des cardiomyocytes pendant la coculture. Ceci peut être envisagé par une approche de type Luminex qui permettra le dosage d'un très grand nombre de cytokines et facteurs solubles présents dans les surnageants des cellules hMADS et des cocultures. Cette approche nous permettra de mieux caractériser les mécanismes de régénération médiés par les cellules souches que sont les effets paracrines et la fusion partielle.

Les études présentées dans ce travail devront être renouvelées dans un contexte de coculture avec des cardiomyocytes humains fraîchement isolés. La possibilité d'obtenir des myocardiocytes humains prélevés sur des patients en cours de transplantation cardiaque est un projet de collaboration avec le service de chirurgie cardiaque de l'hôpital Henri Mondor de Créteil. Ce type de coculture nous permettra d'obtenir de précieuses informations sur la possibilité de reprogrammation intra-espèce.

Enfin les travaux préliminaires sur les cocultures entre les cellules hMADS et les neurones ganglionnaires sont encourageants et semblent indiquer que la méthode de reprogrammation est applicable pour l'obtention d'autres types de progéniteurs d'intérêt thérapeutique.

Le modèle de coculture avec les cellules hMADS représente donc un outil très intéressant pour l'étude du phénomène de reprogrammation après fusion cellulaire partielle et peut être étendu à de nombreux types cellulaires.

Les résultats à venir sur les cellules souches, notamment les cellules hMADS, devraient permettre de mieux comprendre le potentiel régénérateur de ces cellules et d'optimiser leurs capacités de réparation tissulaire qui quelque fois demeurent décevantes, notamment dans le cadre de la reconstruction cardiaque lors d'un infarctus. Ce potentiel pourra également être étendu au traitement d'autres pathologies extra-cardiaques telles que les maladies neurodégénératives du système nerveux central.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Ahkong, Q. F., Howell, J. I., Lucy, J. A., Safwat, F., Davey, M. R. & Cocking, E. C. 1975 Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. *Nature* **255**, 66-7.
- Allsopp, R. C., Morin, G. B., DePinho, R., Harley, C. B. & Weissman, I. L. 2003 Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* **102**, 517-20.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. 1992 Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10114-8.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J. & Alvarez-Buylla, A. 2003 Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P. J., Epstein, J. A. & Morrissey, E. E. 2011 Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* **8**, 376-88.
- Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., Halvorsen, Y. D., Hicok, K., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G. D. & Gimble, J. M. 2004 Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* **6**, 7-14.
- Awad, H. A., Halvorsen, Y. D., Gimble, J. M. & Guilak, F. 2003 Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* **9**, 1301-12.
- Azarnoush, K., Maurel, A., Sebbah, L., Carrion, C., Bissery, A., Mandet, C., Pouly, J., Bruneval, P., Hagege, A. A. & Menasche, P. 2005 Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Thorac Cardiovasc Surg* **130**, 173-9.
- Balsam, L. B., Wagers, A. J., Christensen, J. L., Kofidis, T., Weissman, I. L. & Robbins, R. C. 2004 Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* **428**, 668-673.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H. & Ochiya, T. 2007 Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* **46**, 219-28.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. & Clevers, H. 2007 Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-7.
- Barrilleaux, B., Phinney, D. G., Prockop, D. J. & O'Connor, K. C. 2006 Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* **12**, 3007-19.
- Bassand, J. P., Hamm, C. W., Ardissino, D., Boersma, E., Budaj, A., Fernandez-Aviles, F., Fox, K. A., Hasdai, D., Ohman, E. M., Wallentin, L. & Wijns, W. 2007 Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* **28**, 1598-660.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B. & Anversa, P. 2003 Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763-76.
- Beltrami, A. P., Cesselli, D., Bergamin, N., Marcon, P., Rigo, S., Puppato, E., D'Aurizio, F., Verardo, R., Piazza, S., Pignatelli, A., Poz, A., Baccarani, U., Damiani, D., Fanin, R., Mariuzzi, L., Finato, N., Masolini, P., Burelli, S., Belluzzi, O., Schneider, C. & Beltrami, C. A. 2007 Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* **110**, 3438-46.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S. & Frisen, J. 2009 Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102.
- Berry, C., Murdoch, D. R. & McMurray, J. J. 2001 Economics of chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* **3**, 283-91.

- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. & Sander, C. 2008 The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* **36**, D149-53.
- Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D. & Dick, J. E. 1997 Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5320-5.
- Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S. Y. & Blau, H. M. 2010 Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* **463**, 1042-7.
- Bieback, K., Kern, S., Kluter, H. & Eichler, H. 2004 Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* **22**, 625-34.
- Bittner, R. E., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Hoger, H., Elbe-Burger, A. & Wachtler, F. 1999 Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* **199**, 391-6.
- Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J. & Terzis, A. J. 2005 Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* **5**, 899-904.
- Block, G. J., Ohkouchi, S., Fung, F., Frenkel, J., Gregory, C., Pochampally, R., DiMattia, G., Sullivan, D. E. & Prockop, D. J. 2009 Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* **27**, 670-81.
- Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M. K., Vriend, G. & Scholer, H. R. 1998 New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev* **12**, 2073-90.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. 2005 Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-56.
- Brawley, C. & Matunis, E. 2004 Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* **304**, 1331-4.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. & Blau, H. M. 2000 From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-9.
- Brighton, C. T., Lorch, D. G., Kupcha, R., Reilly, T. M., Jones, A. R. & Woodbury, R. A., 2nd. 1992 The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res*, 287-99.
- Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M. & Fisher, A. G. 1999 Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* **3**, 207-17.
- Bru, T., Clarke, C., McGrew, M. J., Sang, H. M., Wilmut, I. & Blow, J. J. 2008 Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res* **314**, 2634-42.
- Bruder, S. P., Fink, D. J. & Caplan, A. I. 1994 Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* **56**, 283-94.
- Burchfield, J. S. & Dimmeler, S. 2008 Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**, 4.
- Caplan, A. I. 1991 Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-50.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. & Dalton, S. 2005 LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-96.
- Castro, R. F., Jackson, K. A., Goodell, M. A., Robertson, C. S., Liu, H. & Shine, H. D. 2002 Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* **297**, 1299.
- Caussinus, E. & Gonzalez, C. 2005 Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **37**, 1125-9.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. 2003 Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-55.
- Chen, E. H., Grote, E., Mohler, W. & Vignery, A. 2007 Cell-cell fusion. *FEBS Lett* **581**, 2181-93.
- Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., Bierling, P., Hernigou, P., Layrolle, P. & Rouard, H. 2010 Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* **31**, 270-8.

- Chimenti, I., Smith, R. R., Li, T. S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A. & Marban, E. 2010 Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* **106**, 971-80.
- Chinnery, H. R., Pearlman, E. & McMenamin, P. G. 2008 Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol* **180**, 5779-83.
- Chopp, M., Li, Y. & Zhang, Z. G. 2009 Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke* **40**, S143-5.
- Christman, K. L., Vardanian, A. J., Fang, Q., Sievers, R. E., Fok, H. H. & Lee, R. J. 2004 Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* **44**, 654-60.
- Cinti, S. 2005 The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**, 9-15.
- Cole, M. F. & Young, R. A. 2008 Mapping key features of transcriptional regulatory circuitry in embryonic stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**, 183-93.
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weissman, I. L. & Rando, T. A. 2005 Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760-4.
- Condorelli, G., Borello, U., De Angelis, L., Latronico, M., Sirabella, D., Coletta, M., Galli, R., Balconi, G., Follenzi, A., Frati, G., Cusella De Angelis, M. G., Gioglio, L., Amuchastegui, S., Adorini, L., Naldini, L., Vescovi, A., Dejana, E. & Cossu, G. 2001 Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10733-8.
- Cone, R. D. 1999 The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* **10**, 211-216.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. & Bacchetti, S. 1992 Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* **11**, 1921-9.
- Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. 2005 Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science* **309**, 1369-1373.
- Cowan, C. M., Shi, Y. Y., Aalami, O. O., Chou, Y. F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C. H., Wu, B. & Longaker, M. T. 2004 Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* **22**, 560-7.
- Cselenyak, A., Pankotai, E., Horvath, E. M., Kiss, L. & Lacza, Z. 2010 Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol* **11**, 29.
- Cui, L., Yin, S., Liu, W., Li, N., Zhang, W. & Cao, Y. 2007 Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng* **13**, 1185-95.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Menei, P., Roos, B. A. & Schiller, P. C. 2004 Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* **117**, 2971-81.
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I. & Nardi, N. B. 2008 In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2287-99.
- Darr, H., Mayshar, Y. & Benvenisty, N. 2006 Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* **133**, 1193-201.
- Davies, P. S., Powell, A. E., Swain, J. R. & Wong, M. H. 2009 Inflammation and proliferation act together to mediate intestinal cell fusion. *PLoS One* **4**, e6530.
- Davis, F. & Adelberg, E. 1973 Use of somatic cell hybrids for analysis of the differentiated state. *Bacteriological Reviews* **37**, 197-214.
- Dawn, B., Stein, A. B., Urbanek, K., Rota, M., Whang, B., Rastaldo, R., Torella, D., Tang, X. L., Rezazadeh, A., Kajstura, J., Leri, A., Hunt, G., Varma, J., Prabhu, S. D., Anversa, P. & Bolli, R. 2005 Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3766-71.
- Deb, A., Wang, S., Skelding, K. A., Miller, D., Simper, D. & Caplice, N. M. 2003 Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* **107**, 1247-9.

- Delahaye, F., de Gevigney, G., Gaillard, S. & Cheneau, E. 1998 [Epidemiology and economic impact of heart failure in France]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **91**, 1307-14.
- Delcayre, C. & Swynghedauw, B. 2002 Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 1577-84.
- Delree, P., Leprince, P., Schoenen, J. & Moonen, G. 1989 Purification and culture of adult rat dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci Res* **23**, 198-206.
- Demetri, G. D., Fletcher, C. D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B. M. & Singer, S. 1999 Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3951-6.
- Dhein, S., Mohr, F., Delmar, M. & Salameh, A. 2005 Culture of Neonatal Cardiomyocytes. In *Practical Methods in Cardiovascular Research*, pp. 568-576: Springer Berlin Heidelberg.
- Dispersyn, G. D., Geuens, E., Ver Donck, L., Ramaekers, F. C. & Borgers, M. 2001 Adult rabbit cardiomyocytes undergo hibernation-like dedifferentiation when co-cultured with cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* **51**, 230-40.
- Djukic, M., Mildner, A., Schmidt, H., Czesnik, D., Bruck, W., Priller, J., Nau, R. & Prinz, M. 2006 Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* **129**, 2394-403.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-7.
- Dominici, M., Rasini, V., Bussolari, R., Chen, X., Hofmann, T. J., Spano, C., Bernabei, D., Veronesi, E., Bertoni, F., Paolucci, P., Conte, P. & Horwitz, E. M. 2009 Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood* **114**, 2333-43.
- Doyonnas, R., LaBarge, M. A., Sacco, A., Charlton, C. & Blau, H. M. 2004 Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13507-12.
- Drenckhahn, J. D., Schwarz, Q. P., Gray, S., Laskowski, A., Kiriazis, H., Ming, Z., Harvey, R. P., Du, X. J., Thorburn, D. R. & Cox, T. C. 2008 Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. *Dev Cell* **15**, 521-33.
- Duelli, D. & Lazebnik, Y. 2003 Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* **3**, 445-8.
- Duelli, D. & Lazebnik, Y. 2007 Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 968-76.
- Edelberg, J. M., Tang, L., Hattori, K., Lyden, D. & Rafii, S. 2002 Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* **90**, E89-93.
- Egli, D., Birkhoff, G. & Eggan, K. 2008 Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 505-16.
- Egli, D., Rosains, J., Birkhoff, G. & Eggan, K. 2007 Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* **447**, 679-85.
- Eglitis, M. A. & Mezey, E. 1997 Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4080-5.
- Eisenberg, L. M., Burns, L. & Eisenberg, C. A. 2003 Hematopoietic cells from bone marrow have the potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **274**, 870-82.
- Erol, A. 2005 Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Med Hypotheses* **65**, 525-9.
- Espejel, S., Romero, R. & Alvarez-Buylla, A. 2009 Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann Neurol* **66**, 100-9.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. 1981 Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. 2005 The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310**, 1817-21.

- Farrington-Rock, C., Crofts, N. J., Doherty, M. J., Ashton, B. A., Griffin-Jones, C. & Canfield, A. E. 2004 Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* **110**, 2226-32.
- Feng, J., Mantesso, A., De Bari, C., Nishiyama, A. & Sharpe, P. T. 2011 Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 6503-8.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. 1998 Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-30.
- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G. & Blasco, M. A. 2008 The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* **22**, 654-67.
- Flynn, A. & O'Brien, T. 2011 Stem cell therapy for cardiac disease. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 177-87.
- Freberg, C. T., Dahl, J. A., Timoskainen, S. & Collas, P. 2007 Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell* **18**, 1543-53.
- Freyman, T., Polin, G., Osman, H., Crary, J., Lu, M., Cheng, L., Palasis, M. & Wilensky, R. L. 2006 A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* **27**, 1114-1122.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F. & Keiliss-Borok, I. V. 1974a Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**, 331-40.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A. & Rudakow, I. A. 1974b Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* **2**, 83-92.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. 1968 Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-47.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky, S., II & Petrakova, K. V. 1966 Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **16**, 381-90.
- Fuchs, E. 2007 Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**, 834-42.
- Gao, S., Gasparrini, B., McGarry, M., Ferrier, T., Fletcher, J., Harkness, L., De Sousa, P. & Wilmut, I. 2002 Germinal vesicle material is essential for nucleus remodeling after nuclear transfer. *Biol Reprod* **67**, 928-34.
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Arranz, M. & Herreros, D. 2008 Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* **8**, 1417-23.
- Geiger, H. & Van Zant, G. 2002 The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* **3**, 329-333.
- Geraerts, M. & Verfaillie, C. M. 2009 Adult stem and progenitor cells. In *Engineering of Stem Cells*, vol. 114 (ed. U. Martin), pp. 1-21: Springer US.
- Gerdes, H.-H., Bukoreshtliev, N. V. & Barroso, J. F. V. 2007 Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Letters* **581**, 2194-2201.
- Geuna, S., Raimondo, S., Ronchi, G., Di Scipio, F., Tos, P., Czaja, K. & Fornaro, M. 2009 Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* **87**, 27-46.
- Ghodsizad, A., Niehaus, M., Kogler, G., Martin, U., Wernet, P., Bara, C., Khaladj, N., Loos, A., Makoui, M., Thiele, J., Mengel, M., Karck, M., Klein, H. M., Haverich, A. & Ruyter, A. 2009 Transplanted human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells improve left-ventricular function and prevent left-ventricular dilation and scar formation after acute myocardial infarction. *Heart* **95**, 27-35.
- Ghostine, S., Carrion, C., Souza, L. C., Richard, P., Bruneval, P., Vilquin, J. T., Pouzet, B., Schwartz, K., Menasche, P. & Hagege, A. A. 2002 Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* **106**, 1131-6.
- Gibson, A. J., Karasinski, J., Relvas, J., Moss, J., Sherratt, T. G., Strong, P. N. & Watt, D. J. 1995 Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. *J Cell Sci* **108 (Pt 1)**, 207-14.
- Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y. & Pikarsky, E. 2003 Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* **4**, 361-70.
- Gimble, J. M., Katz, A. J. & Bunnell, B. A. 2007 Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res* **100**, 1249-1260.

- Gnecchi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L. G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R. E., Ingwall, J. S. & Dzau, V. J. 2005 Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* **11**, 367-8.
- Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L. G., Pratt, R. E., Ingwall, J. S. & Dzau, V. J. 2006 Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J* **20**, 661-9.
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., Gonzalez, M. A., Rico, L., Buscher, D. & Delgado, M. 2009 Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* **58**, 929-39.
- Gonzalez-Rey, E., Gonzalez, M. A., Varela, N., O'Valle, F., Hernandez-Cortes, P., Rico, L., Buscher, D. & Delgado, M. 2010 Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **69**, 241-8.
- Grisendi, G., Bussolari, R., Cafarelli, L., Petak, I., Rasini, V., Veronesi, E., De Santis, G., Spano, C., Tagliazzucchi, M., Barti-Juhasz, H., Scarabelli, L., Bambi, F., Frassoldati, A., Rossi, G., Casali, C., Morandi, U., Horwitz, E. M., Paolucci, P., Conte, P. & Dominici, M. 2010 Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* **70**, 3718-29.
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W. & Gimble, J. M. 2001 Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* **189**, 54-63.
- Gruh, I. & Martin, U. 2009 Transdifferentiation of stem cells: a critical view. In *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 114 (ed. U. Martin), pp. 73-106: Springer US.
- Guo, J., Lin, G. S., Bao, C. Y., Hu, Z. M. & Hu, M. Y. 2007 Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* **30**, 97-104.
- Gurdon, J. B. & Uehlinger, V. 1966 "Fertile" intestine nuclei. *Nature* **210**, 1240-1.
- Gurke, S., Barroso, J. F. & Gerdes, H. H. 2008 The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem Cell Biol* **129**, 539-50.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. & Mulligan, R. C. 1999 Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4.
- Hakelien, A. M., Landsverk, H. B., Robl, J. M., Skalhegg, B. S. & Collas, P. 2002 Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* **20**, 460-6.
- Hambardzumyan, D., Squatrito, M. & Holland, E. C. 2006 Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell* **10**, 454-6.
- Hamdi, H., Furuta, A., Bellamy, V., Bel, A., Puymirat, E., Peyrard, S., Agbulut, O. & Menasche, P. 2009 Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg* **87**, 1196-203.
- Hansis, C., Barreto, G., Maltry, N. & Niehrs, C. 2004 Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr Biol* **14**, 1475-80.
- Hansson, E. M., Lindsay, M. E. & Chien, K. R. 2009 Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* **5**, 364-77.
- Harman, D. 1956 Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Harris, H. & Watkins, J. F. 1965 Hybrid Cells Derived from Mouse and Man: Artificial Heterokaryons of Mammalian Cells from Different Species. *Nature* **205**, 640-6.
- Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C. & Jaenisch, R. 2005 Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* **121**, 465-77.
- Hodgson, D. M., Behfar, A., Zingman, L. V., Kane, G. C., Perez-Terzic, C., Alekseev, A. E., Puceat, M. & Terzic, A. 2004 Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H471-9.
- Horsley, V. & Pavlath, G. K. 2004 Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs* **176**, 67-78.
- Hou, D., Youssef, E. A., Brinton, T. J., Zhang, P., Rogers, P., Price, E. T., Yeung, A. C., Johnstone, B. H., Yock, P. G. & March, K. L. 2005 Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and

- interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* **112**, 1150-6.
- Houghton, J., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A. B., Carlson, J., Li, H., Cai, X., Fox, J. G., Goldenring, J. R. & Wang, T. C. 2004 Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* **306**, 1568-71.
- Houghton, J. & Wang, T. C. 2005 Helicobacter pylori and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology* **128**, 1567-78.
- Hsieh, P. C., Segers, V. F., Davis, M. E., MacGillivray, C., Gannon, J., Molkenkin, J. D., Robbins, J. & Lee, R. T. 2007 Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* **13**, 970-4.
- Huppertz, B., Frank, H. G., Kingdom, J. C., Reister, F. & Kaufmann, P. 1998 Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* **110**, 495-508.
- Huppertz, B., Tews, D. S. & Kaufmann, P. 2001 Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int Rev Cytol* **205**, 215-53.
- Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G. & Srivastava, D. 2010 Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375-86.
- Iso, Y., Spees, J. L., Serrano, C., Bakondi, B., Pochampally, R., Song, Y. H., Sobel, B. E., Delafontaine, P. & Prockop, D. J. 2007 Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 700-6.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiya, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., Mak, T. W. & Suda, T. 2004 Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**, 997-1002.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y. & Lemischka, I. R. 2006 Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* **442**, 533-8.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. & Goodell, M. A. 2001 Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**, 1395-402.
- Jaenisch, R. 2009 Stem cells, pluripotency and nuclear reprogramming. *J Thromb Haemost* **7 Suppl 1**, 21-3.
- Jennings, R. B. & Reimer, K. A. 1983 Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* **68**, 125-36.
- Jeon, O., Rhie, J. W., Kwon, I. K., Kim, J. H., Kim, B. S. & Lee, S. H. 2008 In vivo bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng Part A* **14**, 1285-94.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. & Verfaillie, C. M. 2002a Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-9.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M. & Verfaillie, C. M. 2002b Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* **30**, 896-904.
- Jin, D. K., Shido, K., Kopp, H. G., Petit, I., Shmelkov, S. V., Young, L. M., Hooper, A. T., Amano, H., Avecilla, S. T., Heissig, B., Hattori, K., Zhang, F., Hicklin, D. J., Wu, Y., Zhu, Z., Dunn, A., Salari, H., Werb, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Lyden, D. & Rafii, S. 2006 Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med* **12**, 557-67.
- Johansson, C. B., Youssef, S., Kolekar, K., Holbrook, C., Doyonnas, R., Corbel, S. Y., Steinman, L., Rossi, F. M. & Blau, H. M. 2008 Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat Cell Biol* **10**, 575-83.
- Jopling, C., Boue, S. & Izpisua Belmonte, J. C. 2011 Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 79-89.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A. & Belmonte, J. C. 2010 Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* **464**, 606-9.
- Kajstura, J., Rota, M., Hall, S. R., Hosoda, T., D'Amario, D., Sanada, F., Zheng, H., Ogorek, B., Rondon-Clavo, C., Ferreira-Martins, J., Matsuda, A., Arranto, C., Goichberg, P., Giordano, G., Haley, K. J., Bardelli, S.,

- Rayatzadeh, H., Liu, X., Quaini, F., Liao, R., Leri, A., Perrella, M. A., Loscalzo, J. & Anversa, P. 2011 Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* **364**, 1795-806.
- Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafe, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A. & Anversa, P. 2005 Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* **96**, 127-37.
- Kaplan, F. S., Hahn, G. V. & Zasloff, M. A. 1994 Heterotopic Ossification: Two Rare Forms and What They Can Teach Us. *J Am Acad Orthop Surg* **2**, 288-296.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L. 2001 Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**, 407-14.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Scholer, H. R. & Tomilin, A. 2004 Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* **5**, 1078-83.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. & Bieback, K. 2006 Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294-301.
- Kerr, C. L., Gearhart, J. D., Elliott, A. M. & Donovan, P. J. 2006 Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. *Semin Reprod Med* **24**, 304-13.
- Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J. W., Stricker, D. M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y. D., Cheatham, B., Storms, R. W. & Gimble, J. M. 2007 Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* **212**, 702-9.
- Kimble, J. E. & White, J. G. 1981 On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **81**, 208-19.
- Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. & Tada, T. 2004 Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol Cell Biol* **24**, 5710-20.
- King, M. P. & Attardi, G. 1989 Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**, 500-3.
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S. & Epstein, S. E. 2004 Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* **109**, 1543-9.
- Klose, R. J. & Bird, A. P. 2006 Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**, 89-97.
- Koninckx, R., Hensen, K., Daniels, A., Moreels, M., Lambrichts, I., Jongen, H., Clijsters, C., Mees, U., Steels, P., Hendrikx, M. & Rummens, J. L. 2009 Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity. *Cytotherapy* **11**, 778-92.
- Kortesidis, A., Zannettino, A., Isenmann, S., Shi, S., Lapidot, T. & Gronthos, S. 2005 Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* **105**, 3793-801.
- Kotoula, V., Papamichos, S. I. & Lambropoulos, A. F. 2008 Revisiting OCT4 expression in peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cells* **26**, 290-1.
- Kouzarides, T. 2007 Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Koyanagi, M., Brandes, R. P., Haendeler, J., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. 2005 Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* **96**, 1039-41.
- Krause, K., Schneider, C., Kuck, K. H. & Jaquet, K. 2010 Stem cell therapy in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Ther* **28**, e101-10.
- Krause, U., Harter, C., Seckinger, A., Wolf, D., Reinhard, A., Bea, F., Dengler, T., Hardt, S., Ho, A., Katus, H. A., Kuecherer, H. & Hansen, A. 2007 Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev* **16**, 31-7.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. & Rudnicki, M. A. 2007 Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**, 999-1010.

- Kutschka, I., Kofidis, T., Chen, I. Y., von Degenfeld, G., Zwierzchoniewska, M., Hoyt, G., Arai, T., Lebl, D. R., Hendry, S. L., Sheikh, A. Y., Cooke, D. T., Connolly, A., Blau, H. M., Gambhir, S. S. & Robbins, R. C. 2006 Adenoviral human BCL-2 transgene expression attenuates early donor cell death after cardiomyoblast transplantation into ischemic rat hearts. *Circulation* **114**, 1174-80.
- LaBarge, M. A. & Blau, H. M. 2002 Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**, 589-601.
- Labrie, J. E., 3rd, Sah, A. P., Allman, D. M., Cancro, M. P. & Gerstein, R. M. 2004 Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *J Exp Med* **200**, 411-23.
- Laflamme, M. A., 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. 2007 Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotech* **25**, 1015-1024.
- Laflamme, M. A. & Murry, C. E. 2005 Regenerating the heart. *Nat Biotech* **23**, 845-856.
- Lai, M. I., Wendy-Yeo, W. Y., Ramasamy, R., Nordin, N., Rosli, R., Veerakumarasivam, A. & Abdullah, S. 2011 Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *J Assist Reprod Genet* **28**, 291-301.
- Lee, J., Kim, H. K., Rho, J. Y., Han, Y. M. & Kim, J. 2006a The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* **281**, 33554-65.
- Lee, J. H., Rhie, J. W., Oh, D. Y. & Ahn, S. T. 2008 Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 456-60.
- Lee, J. Y., Qu-Petersen, Z., Cao, B., Kimura, S., Jankowski, R., Cummins, J., Usas, A., Gates, C., Robbins, P., Wernig, A. & Huard, J. 2000 Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* **150**, 1085-100.
- Lee, R. H., Seo, M. J., Reger, R. L., Spees, J. L., Pulin, A. A., Olson, S. D. & Prockop, D. J. 2006b Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17438-43.
- Lengner, C. J., Camargo, F. D., Hochedlinger, K., Welstead, G. G., Zaidi, S., Gokhale, S., Scholer, H. R., Tomilin, A. & Jaenisch, R. 2007 Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **1**, 403-15.
- Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G. & Poss, K. D. 2006 A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* **127**, 607-19.
- Leri, A., Kajstura, J. & Anversa, P. 2005 Identity deception: not a crime for a stem cell. *Physiology (Bethesda)* **20**, 162-8.
- Lessard, J. A. & Crabtree, G. R. 2010 Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 503-32.
- Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. 2007 The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-19.
- Li, X., Yao, J., Wu, L., Jing, W., Tang, W., Lin, Y., Tian, W. & Liu, L. 2010 Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation in vivo. *Artif Organs* **34**, 46-54.
- Liang, Y., Van Zant, G. & Szilvassy, S. J. 2005 Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **106**, 1479-87.
- Liedtke, S., Stephan, M. & Kogler, G. 2008 Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem* **389**, 845-50.
- Lien, C. L., Schebesta, M., Makino, S., Weber, G. J. & Keating, M. T. 2006 Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol* **4**, e260.
- Lin, Y., Wang, T., Wu, L., Jing, W., Chen, X., Li, Z., Liu, L., Tang, W., Zheng, X. & Tian, W. 2007 Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *J Biomed Mater Res A* **81**, 900-10.
- Lipinski, M. J., Biondi-Zoccai, G. G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H. S., Kang, H. J., Strauer, B. E. & Vetrovec, G. W. 2007 Impact of intracoronary cell therapy on left

- ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* **50**, 1761-7.
- Liu, H., Chu, Y. & Lou, G. 2010 Fiber-modified adenovirus can mediate human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-based anti-angiogenic gene therapy. *Biotechnol Lett* **32**, 1181-8.
- Liu, Z. & Butow, R. A. 2006 Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* **40**, 159-85.
- Loutit, J. F. & Nisbet, N. W. 1982 The origin of osteoclasts. *Immunobiology* **161**, 193-203.
- Mack, G. S. 2006 Trial set to test how stem cells heal a broken heart. *Nat Med* **12**, 483.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. & Ogawa, S. 1999 Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103**, 697-705.
- Mali, P., Ye, Z., Hommond, H. H., Yu, X., Lin, J., Chen, G., Zou, J. & Cheng, L. 2008 Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* **26**, 1998-2005.
- Mani, K. 2008 Programmed cell death in cardiac myocytes: strategies to maximize post-ischemic salvage. *Heart Fail Rev* **13**, 193-209.
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R. & Young, R. A. 2008 Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* **134**, 521-33.
- Martin, C. M., Meeson, A. P., Robertson, S. M., Hawke, T. J., Richardson, J. A., Bates, S., Goetsch, S. C., Gallardo, T. D. & Garry, D. J. 2004 Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* **265**, 262-75.
- Martin, G. R. 1981 Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-8.
- Martin, R. J., Hausman, G. J. & Hausman, D. B. 1998 Regulation of adipose cell development in utero. *Proc Soc Exp Biol Med* **219**, 200-10.
- Masui, S. 2010 Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. *Int J Hematol* **91**, 360-72.
- Mauney, J. R., Nguyen, T., Gillen, K., Kirker-Head, C., Gimble, J. M. & Kaplan, D. L. 2007 Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* **28**, 5280-90.
- McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Ting, J. P., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. & Gimble, J. M. 2006 The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* **24**, 1246-53.
- Menasche, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J. T., Marolleau, J. P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M. & Hagege, A. A. 2008 The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* **117**, 1189-200.
- Meshorer, E. & Misteli, T. 2006 Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 540-6.
- Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G. & Giacomello, A. 2004 Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* **95**, 911-21.
- Mezey, E. 2011 Adult Stem Cell Plasticity Revisited. In *Adult Stem Cells: Biology and Methods of Analysis* (ed. D. G. Phinney), pp. 113-131: Humana Press.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. 2000 Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-82.
- Mezey, E., Key, S., Vogelsang, G., Szalayova, I., Lange, G. D. & Crain, B. 2003 Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1364-9.
- Mighell, A. J., Smith, N. R., Robinson, P. A. & Markham, A. F. 2000 Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett* **468**, 109-14.

- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L. & Pelicci, P. G. 1999 The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**, 309-13.
- Miller, F. R., Mohamed, A. N. & McEachern, D. 1989 Production of a more aggressive tumor cell variant by spontaneous fusion of two mouse tumor subpopulations. *Cancer Res* **49**, 4316-21.
- Miller, S. W., Trimmer, P. A., Parker, W. D., Jr. & Davis, R. E. 1996 Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties. *J Neurochem* **67**, 1897-907.
- Mills, J. C. & Gordon, J. I. 2001 The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12334-6.
- Mimeault, M. & Batra, S. K. 2006 Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* **24**, 2319-45.
- Mimeault, M. & Batra, S. K. 2008 Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* **4**, 27-49.
- Mimeault, M., Hauke, R. & Batra, S. K. 2007 Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* **82**, 252-64.
- Mirotsov, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gnechchi, M. & Dzau, V. J. 2011 Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **50**, 280-9.
- Mitra, R. & Morad, M. 1985 A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol* **249**, H1056-60.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. 2003 The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-42.
- Monassier, J. P. & Monassier, L. 2007 [Postinfarction management]. *Presse Med* **36**, 999-1006.
- Mori, K. J., Fujitake, H., Ohkubo, H., Ito, Y. & Dexter, T. M. 1978 Development of stromal cell colonies in bone marrow cell culture. *Gann* **69**, 689-93.
- Morrison, S. J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M. & Weissman, I. L. 1995 The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10302-6.
- Morrison, S. J. & Kimble, J. 2006 Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-74.
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Akashi, K., Globerson, A. & Weissman, I. L. 1996 The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **2**, 1011-6.
- Moscoco, I., Barallobre, J., de Ilarduya, O. M., Anon, P., Fraga, M., Calvino, R., Aldama, G. & Domenech, N. 2009 Analysis of different routes of administration of heterologous 5-azacytidine-treated mesenchymal stem cells in a porcine model of myocardial infarction. *Transplant Proc* **41**, 2273-5.
- Muller-Ehmsen, J., Whittaker, P., Kloner, R. A., Dow, J. S., Sakoda, T., Long, T. I., Laird, P. W. & Kedes, L. 2002 Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 107-16.
- 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 Riviere, A. B., Passier, R. & Tertoolen, L. 2003 Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* **107**, 2733-40.
- Murchison, E. P., Partridge, J. F., Tam, O. H., Cheloufi, S. & Hannon, G. J. 2005 Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12135-40.
- Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B. S., Ismail Virag, J., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A. & Field, L. J. 2004 Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* **428**, 664-668.
- Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., Tokudome, T., Mori, H., Miyatake, K. & Kitamura, S. 2005 Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* **112**, 1128-35.

- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M. S. & Niwa, H. 2006 Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **26**, 7772-82.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H. & Smith, A. 1998 Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-91.
- Niemeyer, P., Vohrer, J., Schmal, H., Kasten, P., Fellenberg, J., Suedkamp, N. P. & Mehlhorn, A. T. 2008 Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice. *Cytotherapy* **10**, 784-95.
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A. & Muramatsu, M. 1999 The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* **19**, 5453-65.
- Nishiyama, N., Miyoshi, S., Hida, N., Uyama, T., Okamoto, K., Ikegami, Y., Miyado, K., Segawa, K., Terai, M., Sakamoto, M., Ogawa, S. & Umezawa, A. 2007 The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* **25**, 2017-24.
- Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. 2000 Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-6.
- Nnodim, J. O. 1987 Development of adipose tissues. *Anat Rec* **219**, 331-7.
- Nora, J. J., Fraser, F. C., Patterson, D., Greenberg, C. R., Warburton, D. & Bear, J. 1994. In *Medical genetics, principles and practice* (ed. L. a. Febiger), pp. 345-353. Philadelphia.
- Nygren, J. M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B. K. & Jacobsen, S. E. W. 2004 Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* **10**, 494-501.
- Nygren, J. M., Liuba, K., Breitbach, M., Stott, S., Thoren, L., Roell, W., Geisen, C., Sasse, P., Kirik, D., Bjorklund, A., Nerlov, C., Fleischmann, B. K., Jovinge, S. & Jacobsen, S. E. 2008 Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nat Cell Biol* **10**, 584-92.
- Ogle, B. M., Cascalho, M. & Platt, J. L. 2005 Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 567-75.
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., Entman, M. L. & Schneider, M. D. 2003 Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12313-8.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. 1997 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-9.
- Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. 2007 Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-7.
- Olivares, E. L., Ribeiro, V. P., Werneck de Castro, J. P., Ribeiro, K. C., Mattos, E. C., Goldenberg, R. C., Mill, J. G., Dohmann, H. F., dos Santos, R. R., de Carvalho, A. C. & Masuda, M. O. 2004 Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H464-70.
- Onfelt, B., Nedvetzki, S., Benninger, R. K., Purbhoo, M. A., Sowinski, S., Hume, A. N., Seabra, M. C., Neil, M. A., French, P. M. & Davis, D. M. 2006 Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* **177**, 8476-83.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. & Anversa, P. 2001 Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.
- Orr, W. C. & Sohal, R. S. 1994 Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128-30.
- Owen, M. & Friedenstein, A. J. 1988 Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**, 42-60.
- Page, R. L., Malcuit, C. & Dominko, T. 2011 Methods for Inducing Pluripotency. In *Regenerating the Heart* (ed. K. Turksen), pp. 219-239: Humana Press.

- Pain, D., Chirn, G. W., Strassel, C. & Kemp, D. M. 2005 Multiple retropseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification. *J Biol Chem* **280**, 6265-8.
- Pavlicek, A., Paces, J., Zika, R. & Hejnar, J. 2002 Length distribution of long interspersed nucleotide elements (LINEs) and processed pseudogenes of human endogenous retroviruses: implications for retrotransposition and pseudogene detection. *Gene* **300**, 189-94.
- Pawelek, J. M. 2008 Cancer-cell fusion with migratory bone-marrow-derived cells as an explanation for metastasis: new therapeutic paradigms. *Future Oncol* **4**, 449-52.
- Payne, T. R., Oshima, H., Sakai, T., Ling, Y., Gharaibeh, B., Cummins, J. & Huard, J. 2005 Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. *Gene Ther* **12**, 1264-1274.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., Lider, O., Alon, R., Zipori, D. & Lapidot, T. 1999 Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* **283**, 845-8.
- Pereira, L., Yi, F. & Merrill, B. J. 2006 Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol* **26**, 7479-91.
- Perez-Gonzalez, J., Botvinick, E. H., Dunn, R., Rahimtoola, S., Ports, T., Chatterjee, K. & Parmley, W. W. 1982 The late prognostic value of acute scintigraphic measurement of myocardial infarction size. *Circulation* **66**, 960-71.
- Perin, E. C., Dohmann, H. F., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L., Silva, G. V., Mesquita, C. T., Belem, L., Vaughn, W. K., Rangel, F. O., Assad, J. A., Carvalho, A. C., Branco, R. V., Rossi, M. I., Dohmann, H. J. & Willerson, J. T. 2004 Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **110**, II213-8.
- Phinney, D. G. & Prockop, D. J. 2007 Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25**, 2896-902.
- Planat-Benard, V., Menard, C., Andre, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J. M., Penicaud, L. & Casteilla, L. 2004a Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* **94**, 223-9.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L. & Casteilla, L. 2004b Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656-63.
- Plotnikov, E. Y., Khryapenkova, T. G., Vasileva, A. K., Marey, M. V., Galkina, S. I., Isaev, N. K., Sheval, E. V., Polyakov, V. Y., Sukhikh, G. T. & Zorov, D. B. 2008 Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med* **12**, 1622-31.
- Pomerantz, J. & Blau, H. M. 2004 Nuclear reprogramming: A key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol* **6**, 810-816.
- Porat, Y., Porozov, S., Belkin, D., Shimoni, D., Fisher, Y., Belleli, A., Czeiger, D., Silverman, W. F., Belkin, M., Battler, A., Fulga, V. & Savion, N. 2006 Isolation of an adult blood-derived progenitor cell population capable of differentiation into angiogenic, myocardial and neural lineages. *Br J Haematol* **135**, 703-14.
- Poss, K. D., Wilson, L. G. & Keating, M. T. 2002 Heart regeneration in zebrafish. *Science* **298**, 2188-90.
- Potten, C. S. & Loeffler, M. 1990 Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-20.
- Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., Laharrague, P., Penicaud, L., Casteilla, L. & Blancher, A. 2005 Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* **129**, 118-29.
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. & Anversa, P. 2002 Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* **346**, 5-15.
- Raedt, R., Pinxteren, J., Van Dycke, A., Waeytens, A., Craeye, D., Timmermans, F., Vonck, K., Vandekerckhove, B., Plum, J. & Boon, P. 2007 Differentiation assays of bone marrow-derived Multipotent Adult Progenitor Cell (MAPC)-like cells towards neural cells cannot depend on morphology and a limited set of neural markers. *Exp Neurol* **203**, 542-54.

- Raya, A., Koth, C. M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R. M., Sternik, G., Tsai, H. J., Rodriguez-Esteban, C. & Izpisua-Belmonte, J. C. 2003 Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11889-95.
- Redshaw, Z. & Strain, A. J. 2010 Human haematopoietic stem cells express Oct4 pseudogenes and lack the ability to initiate Oct4 promoter-driven gene expression. *J Negat Results Biomed* **9**, 2.
- Reimer, K. A., Jennings, R. B., Cobb, F. R., Murdock, R. H., Greenfield, J. C., Jr., Becker, L. C., Bulkley, B. H., Hutchins, G. M., Schwartz, R. P., Jr., Bailey, K. R. & *et al.* 1985 Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. Comparison of unconscious and conscious dog models. *Circ Res* **56**, 651-65.
- Reinecke, H., Poppa, V. & Murry, C. E. 2002 Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 241-9.
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, E. Z., Ailhaud, G. & Dani, C. 2005a The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* **87**, 125-128.
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E. Z., Dani, C. & Ailhaud, G. 2004 Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315**, 255-263.
- Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J. P., Groux, H., Ailhaud, G. & Dani, C. 2005b Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* **201**, 1397-405.
- Roger, V. L., Weston, S. A., Redfield, M. M., Hellermann-Homan, J. P., Killian, J., Yawn, B. P. & Jacobsen, S. J. 2004 Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* **292**, 344-50.
- Rossi, D. J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J. & Weissman, I. L. 2007a Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **447**, 725-9.
- Rossi, D. J., Seita, J., Czechowicz, A., Bhattacharya, D., Bryder, D. & Weissman, I. L. 2007b Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle* **6**, 2371-6.
- Rota, M., Kajstura, J., Hosoda, T., Bearzi, C., Vitale, S., Esposito, G., Iaffaldano, G., Padin-Iruegas, M. E., Gonzalez, A., Rizzi, R., Small, N., Muraski, J., Alvarez, R., Chen, X., Urbanek, K., Bolli, R., Houser, S. R., Leri, A., Sussman, M. A. & Anversa, P. 2007 Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17783-8.
- Roura, S., Farre, J., Hove-Madsen, L., Prat-Vidal, C., Soler-Botija, C., Galvez-Monton, C., Vilalta, M. & Bayes-Genis, A. 2010 Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic Res Cardiol* **105**, 419-30.
- Rovo, A. & Gratwohl, A. 2008 Plasticity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Chem* **389**, 825-36.
- Roybon, L., Ma, Z., Asztely, F., Fosum, A., Jacobsen, S. E., Brundin, P. & Li, J. Y. 2006 Failure of transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells into neurons. *Stem Cells* **24**, 1594-604.
- Rubart, M., Soonpaa, M. H., Nakajima, H. & Field, L. J. 2004 Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* **114**, 775-83.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P. & Gerdes, H. H. 2004 Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007-10.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M. & Bianco, P. 2007 Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324-36.
- Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., Gimble, J. M. & Rice, H. E. 2002 Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 371-9.
- Salingcamboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A. & Noda, M. 2003 Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* **287**, 289-300.

- Sambrano, G. R., Fraser, I., Han, H., Ni, Y., O'Connell, T., Yan, Z. & Stull, J. T. 2002 Navigating the signalling network in mouse cardiac myocytes. *Nature* **420**, 712-4.
- Scadden, D. T. 2006 The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-9.
- Schaffler, A. & Buchler, C. 2007 Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells--Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* **25**, 818-827.
- Schofield, R. 1978 The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.
- Seaberg, R. M. & van der Kooy, D. 2002 Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci* **22**, 1784-93.
- Sell, S. 2005 Adult stem cell plasticity: introduction to the first issue of stem cell reviews. *Stem Cell Rev* **1**, 1-7.
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. 2004 Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149-55.
- Seo, M. J., Suh, S. Y., Bae, Y. C. & Jung, J. S. 2005 Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 258-64.
- Serafini, M., Dylla, S. J., Oki, M., Heremans, Y., Tolar, J., Jiang, Y., Buckley, S. M., Pelacho, B., Burns, T. C., Frommer, S., Rossi, D. J., Bryder, D., Panoskaltis-Mortari, A., O'Shaughnessy, M. J., Nelson-Holte, M., Fine, G. C., Weissman, I. L., Blazar, B. R. & Verfaillie, C. M. 2007 Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to long-term hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **204**, 129-39.
- Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K. & Temple, S. 2004 Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**, 1338-40.
- Shen, Q., Zhong, W., Jan, Y. N. & Temple, S. 2002 Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development* **129**, 4843-53.
- Shi, S. & Gronthos, S. 2003 Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* **18**, 696-704.
- Skuk, D., Caron, N. J., Goulet, M., Roy, B. & Tremblay, J. P. 2003 Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 951-67.
- Soriano, P. 1999 Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-1.
- Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J. & Prockop, D. J. 2006 Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1283-8.
- Spees, J. L., Whitney, M. J., Sullivan, D. E., Lasky, J. A., Laboy, M., Ylostalo, J. & Prockop, D. J. 2008 Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension. *Faseb J* **22**, 1226-36.
- Stephan, R. P., Reilly, C. R. & Witte, P. L. 1998 Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age. *Blood* **91**, 75-88.
- Stolzing, A., Hescheler, J. & Sethe, S. 2007 Fusion and regenerative therapies: is immortality really recessive? *Rejuvenation Res* **10**, 571-86.
- Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Kogler, G. & Wernet, P. 2002 Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* **106**, 1913-8.
- Strawford, A., Antelo, F., Christiansen, M. & Hellerstein, M. K. 2004 Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E577-88.
- Sumer, H., Liu, J. & Verma, P. J. 2010 The use of signalling pathway inhibitors and chromatin modifiers for enhancing pluripotency. *Theriogenology* **74**, 525-33.
- Suzuki, K., Murtuza, B., Beauchamp, J. R., Smolenski, R. T., Varela-Carver, A., Fukushima, S., Coppen, S. R., Partridge, T. A. & Yacoub, M. H. 2004 Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *Faseb J* **18**, 1153-5.

- Swynghedauw, B. 1999 Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-62.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007 Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861-872.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006 Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663-676.
- Takeda, J., Seino, S. & Bell, G. I. 1992 Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* **20**, 4613-20.
- Tanaka, R., Komine-Kobayashi, M., Mochizuki, H., Yamada, M., Furuya, T., Migita, M., Shimada, T., Mizuno, Y. & Urabe, T. 2003 Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* **117**, 531-9.
- Taylor, D. A., Atkins, B. Z., Hungspreugs, P., Jones, T. R., Reedy, M. C., Hutcheson, K. A., Glower, D. D. & Kraus, W. E. 1998 Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* **4**, 929-33.
- Taylor, M. V. 2000 Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Curr Biol* **10**, R646-8.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. & Scott, E. W. 2002 Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-5.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. 1998 Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-7.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. & Miller, F. D. 2001 Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3**, 778-84.
- Tomazou, E. M. & Meissner, A. 2010 Epigenetic Regulation of Pluripotency. In *The Cell Biology of Stem Cells*, vol. 695 (ed. E. Meshorer & K. Plath), pp. 26-40: Springer US.
- Tomescot, A., Leschik, J., Bellamy, V., Dubois, G., Messas, E., Bruneval, P., Desnos, M., Hagege, A. A., Amit, M., Itskovitz, J., Menasche, P. & Puceat, M. 2007 Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells* **25**, 2200-5.
- Tomita, S., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Kim, E. J., Sakai, T. & Jia, Z. Q. 1999 Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* **100**, 11247-56.
- Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B. M., Sarraf, P., Fletcher, J. A., Fletcher, C. D., Brun, R. P., Mueller, E., Altiock, S., Oppenheim, H., Evans, R. M. & Spiegelman, B. M. 1997 Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 237-41.
- Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M. A., Urbanek, K., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Anversa, P. & Leri, A. 2004 Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* **94**, 514-24.
- Tsonis, P. A., Madhavan, M., Tancous, E. E. & Del Rio-Tsonis, K. 2004 A newt's eye view of lens regeneration. *Int J Dev Biol* **48**, 975-80.
- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. 2008 Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-36.
- Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N. & Ashraf, M. 2006 Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* **98**, 1414-21.
- Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C. A., Bussani, R., Beltrami, A. P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J. & Anversa, P. 2005 Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8692-7.
- Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W. K., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. 2005 Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 733-42.

- Vacquier, V. D. 1979 The fertilizing capacity of sea urchin sperm rapidly decreases after induction of the acrosome reaction. *Dev Growth Differ.* **21**, 61-69.
- van der Weyden, L., Adams, D. J. & Bradley, A. 2002 Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* **11**, 133-64.
- Vassilopoulos, G., Wang, P. R. & Russell, D. W. 2003 Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-4.
- Verfaillie, C. M. 2002 Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology* **12**, 502-508.
- Vignery, A. 2000 Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* **81**, 291-304.
- Vignery, A. 2008 Macrophage fusion: molecular mechanisms. *Methods Mol Biol* **475**, 149-61.
- Wagers, A. J. & Weissman, I. L. 2004 Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* **116**, 639-648.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. & Ho, A. D. 2005 Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **33**, 1402-16.
- Wakitani, S., Saito, T. & Caplan, A. I. 1995 Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417-26.
- Wang, T., Xu, Z., Jiang, W. & Ma, A. 2006 Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol* **109**, 74-81.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S. & Grompe, M. 2003 Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901.
- Weimann, J. M., Charlton, C. A., Brazelton, T. R., Hackman, R. C. & Blau, H. M. 2003a Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2088-93.
- Weimann, J. M., Johansson, C. B., Trejo, A. & Blau, H. M. 2003b Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* **5**, 959-966.
- Whetton, A. D. & Dexter, T. M. 1993 Influence of growth factors and substrates on differentiation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 1044-9.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. 1997 Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-3.
- Wright, J. T. & Hausman, G. J. 1990a Adipose tissue development in the fetal pig examined using monoclonal antibodies. *J Anim Sci* **68**, 1170-5.
- Wright, J. T. & Hausman, G. J. 1990b Monoclonal antibodies against cell surface antigens expressed during porcine adipocyte differentiation. *Int J Obes* **14**, 395-409.
- Wurmser, A. E., Nakashima, K., Summers, R. G., Toni, N., D'Amour, K. A., Lie, D. C. & Gage, F. H. 2004 Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* **430**, 350-6.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R. & Graf, T. 2004 Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117**, 663-76.
- Xie, T. & Spradling, A. C. 2000 A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary. *Science* **290**, 328-30.
- Yamanaka, S. & Blau, H. M. 2010 Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* **465**, 704-12.
- Yanazume, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kawamura, T., Wada, H., Matsumori, A., Kawase, Y., Hirai, M. & Kita, T. 2003 Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol Cell Biol* **23**, 3593-606.
- Yanez, R., Lamana, M. L., Garcia-Castro, J., Colmenero, I., Ramirez, M. & Bueren, J. A. 2006 Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* **24**, 2582-91.

- Yang, Z., von Ballmoos, M. W., Faessler, D., Voelzmann, J., Ortmann, J., Diehm, N., Kalka-Moll, W., Baumgartner, I., Di Santo, S. & Kalka, C. 2010 Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. *Atherosclerosis* **211**, 103-9.
- Yau, T. M., Kim, C., Ng, D., Li, G., Zhang, Y., Weisel, R. D. & Li, R. K. 2005 Increasing transplanted cell survival with cell-based angiogenic gene therapy. *Ann Thorac Surg* **80**, 1779-86.
- Yin, T. & Li, L. 2006 The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* **116**, 1195-201.
- Yoon, J., Shim, W. J., Ro, Y. M. & Lim, D. S. 2005a Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol* **84**, 715-21.
- Yoon, Y. S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J. S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D. H., Johnson, K. L., Aikawa, R., Asahara, T. & Losordo, D. W. 2005b Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* **115**, 326-38.
- Zaglia, T., Dedja, A., Candiotti, C., Cozzi, E., Schiaffino, S. & Ausoni, S. 2009 Cardiac interstitial cells express GATA4 and control dedifferentiation and cell cycle re-entry of adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 653-62.
- Zeng, L., Rahrmann, E., Hu, Q., Lund, T., Sandquist, L., Felten, M., O'Brien, T. D., Zhang, J. & Verfaillie, C. 2006 Multipotent adult progenitor cells from swine bone marrow. *Stem Cells* **24**, 2355-66.
- Zhang, F., Pomerantz, J. H., Sen, G., Palermo, A. T. & Blau, H. M. 2007 Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 4395-4400.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. & Li, L. 2003 Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-41.
- Zhang, S., Wang, D., Estrov, Z., Raj, S., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. 2004 Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* **110**, 3803-7.
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z. & Xu, Y. 2011 Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* **474**, 212-5.
- Zhou, B. B. & Elledge, S. J. 2000 The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-9.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D. A. 2008 In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **455**, 627-32.
- Zimmermann, U. 1982 Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta* **694**, 227-77.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. & Hedrick, M. H. 2002 Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279-95.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. & Hedrick, M. H. 2001 Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-28.

ANNEXE

ANNEXE

Les cellules souches embryonnaires : aspects éthiques et cadre légal

L'étape de dérivation qui mène à la création des cellules ES nécessite la destruction de l'embryon ce qui pose des problèmes éthiques sur son statut et sur la notion de protection et de respect de la dignité humaine.

En France, le débat sur l'embryon et les cellules souches suscite de nombreuses réactions. En effet en Février 2011, le Parlement avait adopté en première lecture le texte de loi qui révisé la loi de bioéthique de 2004. Cette révision prônait le statu quo en ce qui concerne la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires, à savoir l'interdiction du clonage, qu'il soit thérapeutique ou reproductif ainsi que la recherche sur l'embryon. Cependant, à titre dérogatoire et pour une période probatoire de cinq ans (qui passait à une dérogation permanente dans le texte de loi de 2011), cette loi permettait aux chercheurs autorisés de travailler sur des lignées de cellules ES humaines issues d'embryons conçus *in vitro* mais uniquement dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation effectuée sur le territoire français ou sur des lignées de cellules importées de pays étrangers et créées dans les mêmes conditions. Depuis 2006, l'Agence de Biomédecine (autorité gouvernementale) a ainsi accordé 122 autorisations à 35 équipes pour conduire des recherches fondamentales sur des cellules embryonnaires (www.lemonde.fr, édition du 07.04.2011).

Le 8 Avril 2011, le Sénat est allé à l'encontre de l'avis du gouvernement. Les sénateurs ont ratifié en séance la position de leur commission des affaires sociales, qui avait décidé, lors de son examen préalable du texte, de passer d'un régime d'interdiction avec dérogation de ces recherches à un régime d'autorisation réglementée. Sur le fond, les autorisations sont soumises aux mêmes conditions qu'auparavant ; il s'agit donc plus d'une décision symbolique qui vise à sécuriser et pérenniser la position des chercheurs.

ARTICLE

Human Mesenchymal Stem Cells Reprogram Adult Cardiomyocytes Toward a Progenitor-Like State Through Partial Cell Fusion and Mitochondria Transfer

ADRIEN ACQUISTAPACE,^{a,b} THIERRY BRU,^{a,b} PIERRE-FRANÇOIS LESAULT,^{a,b,c} FLORENCE FIGEAC,^{a,b} AMÉLIE E. COUDERT,^{a,b} OLIVIER LE COZ,^{a,b} CHRISTO CHRISTOV,^{a,b,d} XAVIER BAUDIN,^e FRÉDÉRIC AUBER,^f RENÉ YIOU,^{a,b} JEAN-LUC DUBOIS-RANDÉ,^{a,b,c} ANNE-MARIE RODRIGUEZ^{a,b}

^aINSERM U995, Créteil, France; ^bUniversité Paris-Est, Faculté de Médecine, Créteil, France; ^cFédération de Cardiologie, Hôpital Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ^dPlate-forme Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, France; ^ePlate-forme de Recherche "ImagoSeine", Institut Jacques Monod, INSERM, Université Paris Diderot-Paris, Paris, France; ^fService de Chirurgie Pédiatrique Viscérale et Néonatale, Hôpital Armand Trousseau, AP-HP, Paris, France

Key Words. Mesenchymal stem cells • Cardiomyocytes • Cell fusion • Nuclear reprogramming

ABSTRACT

Because stem cells are often found to improve repair tissue including heart without evidence of engraftment or differentiation, mechanisms underlying wound healing are still elusive. Several studies have reported that stem cells can fuse with cardiomyocytes either by permanent or partial cell fusion processes. However, the respective physiological impact of these two processes remains unknown in part because of the lack of knowledge of the resulting hybrid cells. To further characterize cell fusion, we cocultured mouse fully differentiated cardiomyocytes with human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells as a model of adult stem cells. We found that heterologous cell fusion promoted cardiomyocyte reprogramming back to a progenitor-like state. The resulting hybrid cells expressed early cardiac commitment and proliferation markers such as GATA-4, myocyte enhancer factor 2C, Nkx2.5, and Ki67 and exhibited a mouse

genotype. Interestingly, human bone marrow-derived stem cells shared similar reprogramming properties than hMADS cells but not human fibroblasts, which suggests that these features might be common to multipotent cells. Furthermore, cardiac hybrid cells were preferentially generated by partial rather than permanent cell fusion and that intercellular structures composed of f-actin and microtubule filaments were involved in the process. Finally, we showed that stem cell mitochondria were transferred into cardiomyocytes, persisted in hybrids and were required for somatic cell reprogramming. In conclusion, by providing new insights into previously reported cell fusion processes, our data might contribute to a better understanding of stem cell-mediated regenerative mechanisms and thus, the development of more efficient stem cell-based heart therapies. *STEM CELLS* 2011; 29:812–824

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Heart degenerative diseases such as myocardial infarction and heart failure are among the main causes of death in western countries. Such mortality has its roots in the poor ability of the myocardium to restore cardiomyocyte loss upon injury, which explains why rebuilding the damaged heart remains a critical challenge. One of the most promising approaches to repair this organ is cell therapy, particularly which is based on multipotent adult stem cells [1–3] because such cells might benefit from immune privilege [3, 4] and can be expanded on a large scale in vitro [1–3]. However, although many studies suggested the ben-

efit of stem cell grafting, the mechanisms by which such cells contribute to cardiac wound healing remain a matter of debate.

The functional benefit of stem cells may result from several processes, including transdifferentiation into cardiac and endothelial cells [5–7] or secretion of paracrine factors with various effects such as protection against apoptosis and induction of angiogenesis [8]. Another intriguing possibility is that permanent cell fusion between stem cells and resident cardiac cells may promote replacement of the dead myocardium by generating new cardiomyocytes in response to injury. Indeed, several in vivo and in vitro studies involving the Cre/loxP system or transgenic rodents expressing green fluorescent protein (GFP) or β -galactosidase reporter genes showed that both

Author contributions: A.A., T.B., and A.M.R.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; P.F.L., F.F., A.E.C., and O.L.C.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation; C.C. and X.B.: collection and assembly of data; F.A.: provision of study material or patients; R.Y.: conception and design, final approval of manuscript; J.L.D.: financial support, conception and design, final approval of manuscript. A.A. and T.B. contributed equally to this article.

Correspondence: Anne-Marie Rodriguez, Ph.D., INSERM, Unité 955, 8 rue du Général Sarrail, Créteil, F-94010 France. Telephone: +331-4981-3731; Fax: +331-4981-3642; e-mail: anne-marie.rodriguez@inserm.fr. Received October 26, 2010; accepted for publication March 3, 2011; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* March 23, 2011. © AlphaMed Press 1066-5099/2009/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.632

STEM CELLS 2011;29:812–824 www.StemCells.com

adult and embryonic stem cells could fuse with somatic cells such as neurons, hepatocytes, and cardiomyocytes [9–11]. Permanent cell fusion results in the formation of binucleated heterokaryons, which in some cases undergo nuclear fusion to give rise to mononucleated hyperploid synkaryons. In heart tissue, permanent cell fusion has been detected after stem cell delivery in various settings, including the healthy neonatal heart [12], myocardial infarction [13–15], *mdx* dystrophin-deficient cardiomyopathy [16], and monocrotaline-induced hypertension [17]. However, despite evidence of hybrid cells with a cardiac phenotype [13–17], such a phenomenon was described as being extremely rare and led critics to cast doubts on its biological significance [6, 18, 19].

Recently, two *in vitro* studies mimicking the cardiac environment by coculturing stem cells and cardiomyocytes suggested that hybrid cells may be generated by a mechanism other than permanent cell fusion, one that consists of partial cell fusion through transient direct cell-to-cell communication and intercellular exchange of various compounds [20, 21]. This new transient cell fusion pathway, discovered in 2004, is based on the formation of membrane thin channels, referred to as tunneling nanotubes, that mediate membrane continuity between connected cells, sometimes over long distances [22]. These nanotubular structures have been found to connect a broad range of cultured mammalian cells [23] and to permit transfer of several components such as multi-protein complexes [24], organelles [25–27], and pathogens [28–30]. Specially, stem cells and cardiomyocytes have been reported to exchange *in vitro* cytoplasm macromolecules and organelles through intercellular structures resembling nanotubes [20, 21]. However, whether these cellular transfers play a role in cell fate change and tissue repair remains to be formally demonstrated.

Thus, the phenomenon of cell fusion in heart tissue appears to be poorly understood. In particular, the respective physiological importance of partial versus permanent cell fusion processes is unclear, and little is known about the cellular and molecular mechanisms underlying spontaneous generation of hybrid cells as well as the characterization of their phenotypes.

Here, we hypothesized that stem cell-mediated fusion with terminally differentiated cells constitutes a regenerative mechanism by which the nuclei of somatic cells are reprogrammed, thus resulting in selective survival and proliferative advantages. To promote cell fusion events, we developed a species mismatch coculture approach using mouse terminally differentiated cardiomyocytes and human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells [3] as a model of adult stem cells. Using a Cre/loxP system, we found that hMADS cells could reprogram postmitotic murine cardiomyocytes into proliferating cardiac progenitor-like cells through spontaneous cell fusion. In addition, we showed that successful somatic reprogramming of cardiomyocytes required both intercellular structures composed of F-actin and microtubules and transfer of functional stem cell mitochondria into cardiomyocytes.

MATERIALS AND METHODS

Cell Isolation and Culture

For hMADS cell isolation, adipose tissues were obtained from young donors, with written informed consent of the parents, as surgical scraps from surgical specimens obtained from various surgeries, as approved by the Regional Ethical Committee (“Comité de Protection des Personnes Ile de France IX”). hMADS cells were isolated as described previously [3]. Human bone marrow mesenchymal stem (hBMS) cells were a generous gift from Dr. Hélène Rouard (Etablissement Français du Sang, Créteil, France). hBMS cells were isolated from iliac-crest bone marrow aspirates from patients undergoing standard bone

marrow transplantation (Henri Mondor Hospital, Créteil, France) after receiving their informed consent [31].

The human lung fibroblast MRC5 cell line was a gift from Dr. Jorge Boczkowski (INSERM U955, Créteil). hMADS cells, hBMS cells, and MRC5 cells were cultured in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM), 1 g/l glucose containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Dominique Dutscher, Brumath, France, www.dutscher.com), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10 mM HEPES (Invitrogen, Cergy Pontoise, France, www.invitrogen.com) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. As described [3], hMADS cells had the following phenotype: CD44⁺, CD49b⁺, CD105⁺, CD90⁺, CD133⁺, Stro-1⁺, CD34[−], CD15[−], CD117[−], Flk-1[−], Gly-A[−], CD133[−], HLA-DR[−], and HLA-I^{low}.

Generation of hMADS Cells Devoid of Functional Mitochondria (hMADS ρ^0 Cells)

For mitochondrial DNA depletion, hMADS cells were cultivated in DMEM supplemented with 10% FBS and 0.5 µg/ml ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France, www.sigmaaldrich.com), 50 µg/ml uridine, and 100 µg/ml pyruvate for at least 1-month [32–34].

Isolation of Adult Mouse Ventricular Myocytes

Ventricular cardiomyocytes were isolated from hearts of 2–5 months old male mice after intracardiac perfusion of enzymatic solution containing 12.5 µM CaCl₂ (Sigma-Aldrich), 0.1 mg/ml liberase blendzyme IV (Roche Diagnostics, Meylan, France, www.rochediagnostics.fr), 0.14 mg/ml trypsin (Sigma-Aldrich), as described [35]. Cardiomyocytes were obtained from several mouse lines, including C57BL/6J mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France, www.janvier-europe.com), GCAG-GFP transgenic mice [36] (gift of Dr. Fabrice Chrétien, Pasteur Institute, Paris, France) and Rosa26R transgenic mice (gift of Dr. Shaharagim Tajbakhsh, Pasteur Institute).

Coculture with Adult Mouse Cardiomyocytes

Freshly isolated mouse cardiomyocytes were cocultured with hMADS cells, hBMS cells, or MRC5 cells in DMEM supplemented with 10% FBS in a 1:1 ratio, each cell type seeded at 3,500 cells per square centimeter. In experiments preventing physical contact between the two cell types, cardiomyocytes were seeded on cell-culture inserts containing a polycarbonate membrane with a 0.4-µm pore (Millicell, Millipore) placed in 35 mm dishes plated with hMADS cells.

To assess passive human mitochondria transfer, cells were indirectly cocultured by use of polycarbonate cell-culture inserts with an 8-µm pore (Millicell, Millipore, Molsheim, France, www.millipore.com). For coculture with hMADS ρ^0 cells, culture medium was supplemented with 50 µg/ml uridine and 100 µg/ml pyruvate to permit survival of stem cells devoid of functional mitochondria.

Detection of Cell Fusion

For detection of fused cells, hMADS cells were infected with a human serotype V adenovirus-expressing Cre under a cytomegalovirus promoter (gift of Dr. Athanassia Sotiropoulos, Cochin Institute, Paris, France) at a multiplicity of infection of 50 at 72 hours before coculture with Rosa26R cardiomyocytes. Rosa26R mice carried the lacZ gene that encodes for β -galactosidase under the control of an internal stop codon flanked by loxP sites [37]. When Cre-expressing cells fuse with Rosa26R cells, Cre recombinase contacts the genome of Rosa26R cells and excises its floxed stop cassette, thus resulting in expression of LacZ in the fused cells. Consequently, fused cells and their progeny can be detected by Xgal staining

(substrate of β -galactosidase) or by immunocytochemistry with antibodies against β -galactosidase.

Xgal Staining

For Xgal staining, cocultured cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) before being placed in phosphate buffer containing 10 mM $K_3Fe(CN)_6$, 10 mM $K_4Fe(CN)_6$, and 1 mg/ml Xgal (Qiagen, Courtaboeuf, France, www.qiagen.com) at 37°C for 24 hours.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% PFA or methanol-acetone (50:50) and stained with antibodies against GATA-4 (goat polyclonal Ab [pAb], 1:20, R&D Systems, Minneapolis, MN, www.rndsystems.com, or rabbit pAb, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, www.scbt.com), β -galactosidase (chicken pAb, 1:500, Abcam, Cambridge, UK, www.abcam.com), Ki67 (rabbit pAb, 1:500, Abcam), Nkx2.5 (rabbit pAb, 1:50, Santa Cruz Biotechnology), myocyte enhancer factor 2C (MEF-2C; goat pAb, 1:50, Santa Cruz Biotechnology), desmin (rabbit pAb, 1:100, Abcam), cardiac troponin I (cTnI, rabbit pAb, 1:100; Abcam), α -sarcomeric actinin (mouse monoclonal Ab [mAb], 1:500, Sigma-Aldrich), α -smooth actin (rabbit pAb, 1:100, Abcam), prollyl four hydroxylase subunit beta (P4HB; mouse mAb, 1:100, Novus Biologicals, Littleton, CO, www.novusbio.com), GFP (rabbit pAb, 1:100, Gene Tex, Irvine, CA, www.genetex.com), Lamin A/C (rabbit pAb, 1:100, Cell Signaling Technology, Beverly MA, www.cellsignal.com), human Lamin A/C (mouse mAb, 1:100, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK, www.novocastra.co.uk), or human mitochondria (mouse mAb, 1:800, Abcam). Donkey secondary anti-goat, anti-rabbit, anti-chicken, and anti-mouse antibodies (fluorescein isothiocyanate [FITC]-, Cy3-, or Cy5-conjugated, 1:100) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Suffolk, UK, www.jacksonimmuno.com). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). For costaining with phalloidin-rhodamine (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) and FITC-conjugated α -tubulin (mouse mAb, 1:100, Abcam), hMADS cells were fixed with 4% PFA and then with cold acetone. For fluorescence analysis, we used a Zeiss (Le Pecq, France, www.zeiss.fr) Axioplan 2 Imaging microscope.

Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from cells at coculture days 0, 1, 2, 4, and 7 by use of the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen), then reverse-transcribed with the Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and Oligo(dT)₂₀. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed in triplicate on a 7900 RT-PCR detection system (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, www.appliedbiosystems.com) with use of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen). PCR conditions were 50°C for 2 minutes, 95°C for 2 minutes, 45 cycles at 95°C for 15 seconds, and 60°C for 45 seconds, with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase used as the reference gene. Primer sequences are described in supporting information Table 1.

Results are reported as mean \pm SD. Between-group comparisons for biochemical data involved the two-tailed Student's *t* test. *p* < .05 was considered statistically significant.

In Situ Hybridization

Fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments were performed as described previously [38]. Cocultured cells were hybridized with human and mouse COT-1 DNA probes (Roche

Diagnostics and Invitrogen) previously labeled by Nick translation (Roche Diagnostics) with Cy3 and biotin, respectively. Mouse biotin-labeled DNA was detected with a streptavidin-fluorescein conjugate (Sigma-Aldrich). In experiments combining GATA-4 immunocytochemistry and FISH, cocultured cells were stained with GATA-4 and then labeled with all human or all mouse centromere probes conjugated to FITC (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands, www.kreatech.com). After hybridization, nuclei were counterstained with Hoechst and examined by confocal microscopy (Zeiss LSM 510 Meta).

Electronic Microscopy

Coculture-derived cells were fixed overnight in 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, postfixed for 1.5 hours with 1% osmium tetroxide, dehydrated by successive ethanol washes (50%, 70%, 80%, 95%, 100%, and 100%), and impregnated with epoxy resin. After polymerization, 70–80 nm sections were cut by use of a Reichert (Depew, NY, www.reichertspr.com) Ultracut E ultramicrotome, stained with 2% uranyl acetate plus Reynold's lead citrate, and visualized under a Philips CM120 transmission electron microscope.

Inhibition of F-Actin or Microtubule Polymerization

After proper cell adhesion (approximately 6 hours), cocultured cells were treated for 12 hours with 1 μ M nocodazole to inhibit α -tubulin polymerization or 0.5 μ M cytochalasin D or 0.25 μ M latrunculin A, two inhibitors of f-actin polymerization. Inhibitory treatments were repeated 3 days later.

Stem Cell Mitochondria Transfer

Before coculturing, hMADS cells were labeled with MitoTracker Green FM (200 nM, Invitrogen). Images were obtained by time-lapse video microscopy (Leica [Wetzlar, Germany, www.leica-microsystems.com] DMI6000, Metamorph seven acquisition software, Universal Imaging) or fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan 2 Imaging, Axiovision LE 4.6 software).

RESULTS

Fusion of hMADS Cells and Adult Cardiomyocytes Leads to Formation of Hybrid Cells with Cardiac Progenitor-Like Features

To investigate whether hMADS cells were fused with fully differentiated cardiomyocytes, we used a Cre/loxP system that allows lacZ gene expression only in fused cells. Cre-expressing hMADS cells were cocultured with cardiomyocytes from Rosa26R transgenic mice. From 2 days after coculture initiation, we detected colonies of small rounded cells that were lacZ-positive and whose morphology differed from that of both hMADS cells and adult cardiomyocytes (Fig. 1A). Xgal staining was not due to endogenous β -galactosidase activity because cocultures with nongenetically modified hMADS cells and Rosa26R mouse cardiomyocytes were devoid of blue cells (Fig. 1B). In addition, immunocytochemistry revealed that colony-derived cells coexpressed β -galactosidase with the early cardiac transcription factor GATA-4, which suggests that fused cells belonged to the cardiac lineage (Fig. 1C). Again, the presence of false-positive β -galactosidase cells in cocultures was ruled out by immunocytochemistry of cocultures without induction of the Cre/loxP system (Fig. 1D).

To further characterize the phenotype of fused cells, we used immunostaining for GATA-4 with a series of markers directed against cardiac, smooth muscle or fibroblastic cells.

STEM CELLS

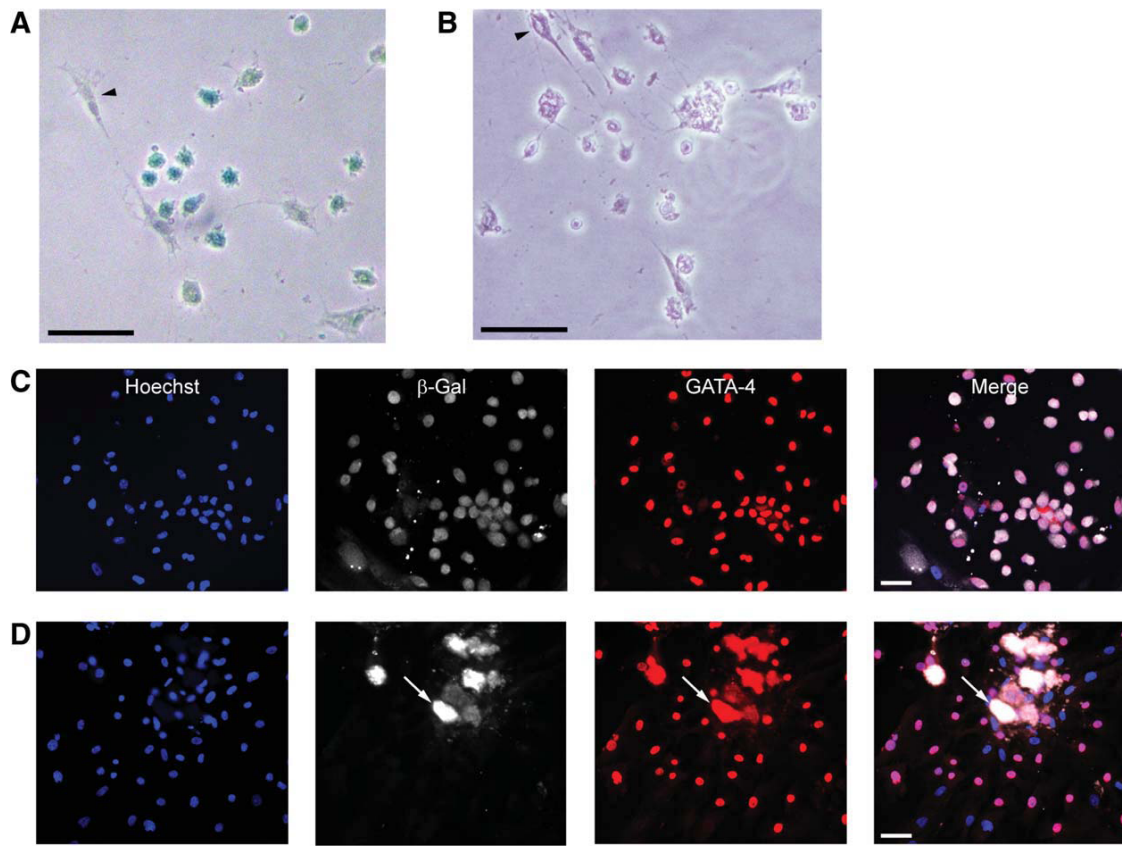


Figure 1. Formation of GATA-4⁺ hybrid cells after fusion of human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells with cardiomyocytes. (A): Detection of hybrid cells (blue) by Xgal staining on day 2 of coculture of Rosa26R cardiomyocytes with Cre-hMADS cells (arrowhead). (B): Negative Xgal staining on coculture with nontransduced hMADS cells (arrowhead). (C, D): Coimmunostaining for β -galactosidase (β -Gal, white) and GATA-4 (red) on day 7 of coculture of Rosa26R cardiomyocytes and (C) Cre-hMADS cells or (D) nontransduced hMADS cells. Arrow, dead cardiomyocyte bodies. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 50 μ m (A–D).

GATA-4⁺ cells expressed early cardiac cell markers such as the transcription factors Nkx2.5 and MEF-2C (Fig. 2A, 2B). In contrast, later cardiac differentiation markers such as desmin and cardiac troponin I (cTnI) were expressed only in a small proportion (<5%) of GATA-4⁺ cells (Fig. 2C, 2D), and α -sarcomeric actinin was never detected (Fig. 2E). Furthermore, GATA-4⁺ colony-derived cells were negatively stained for α -smooth muscle actin and P4HB, which confirms that these cells did not originate from smooth muscle or fibroblastic lineages, respectively (Fig. 2F, 2G). Of note, hMADS cells that were cultured alone showed negative staining for all these antibodies, except P4HB. Finally, hybrid GATA-4⁺ cells expressed Ki67, a cell-cycling and proliferation marker (Fig. 2H and supporting information Fig. 1A). Counting of such hybrids from day 2 to 5 of coculture allowed for estimating their population doubling time at about 24 hours. MTT assay performed from day 8 to 14 of coculture depleted in human stem cells after 5 days of ouabain exposure confirmed the proliferative potential of cardiac hybrid cells. Nevertheless, it also indicated that such potential was limited because cell growth decreased with time to become undetectable after 2 weeks of coculture (supporting information Fig. 1B, 1C).

According to these results, cell fusion between stem cells and postmitotic cardiomyocytes led to the generation of hybrid cells exhibiting proliferative potential, the expression of early cardiac markers, and absence of an organized contractile cytoskeleton. These features were reminiscent of a

cardiac progenitor cell type. Therefore, hybrid cells are hereafter designated cardiac progenitor-like cells.

Cardiac Progenitor-Like Cells Originate from Somatic Reprogramming of Cardiomyocytes, Not from Stem Cell Transdifferentiation

To determine the parental origin of cardiac genes expressed in hybrid cells, we performed qRT-PCR analysis with species-specific primers on cells cocultured from day 0–7. When compared with mouse cardiomyocytes alone, cocultured cells exhibited transcriptional activation of mouse genes involved in early cardiac commitment and proliferation, including GATA-4, MEF-2C, p300 (a histone acetyltransferase implicated in cardiac precursor cell induction [39]), and Ki67, whereas expression of later cardiac mouse genes such as desmin and cardiac troponin T (cTnT) appeared unaffected (Fig. 3A). In contrast, coculture cells and hMADS cells cultivated alone did not differ in human gene expression (Fig. 3B).

qRT-PCR results suggesting a mouse phenotype of cardiac progenitor-like cells were further confirmed by immunostaining for GATA-4 with both human/mouse and human-specific Lamin A/C antibodies and by coculturing GFP⁺ transgenic mouse cardiomyocytes. As expected, progenitor-like GATA-4⁺ cells expressed only mouse Lamin A/C, as shown by the negative stain with human-specific antibody (Fig. 3C). In

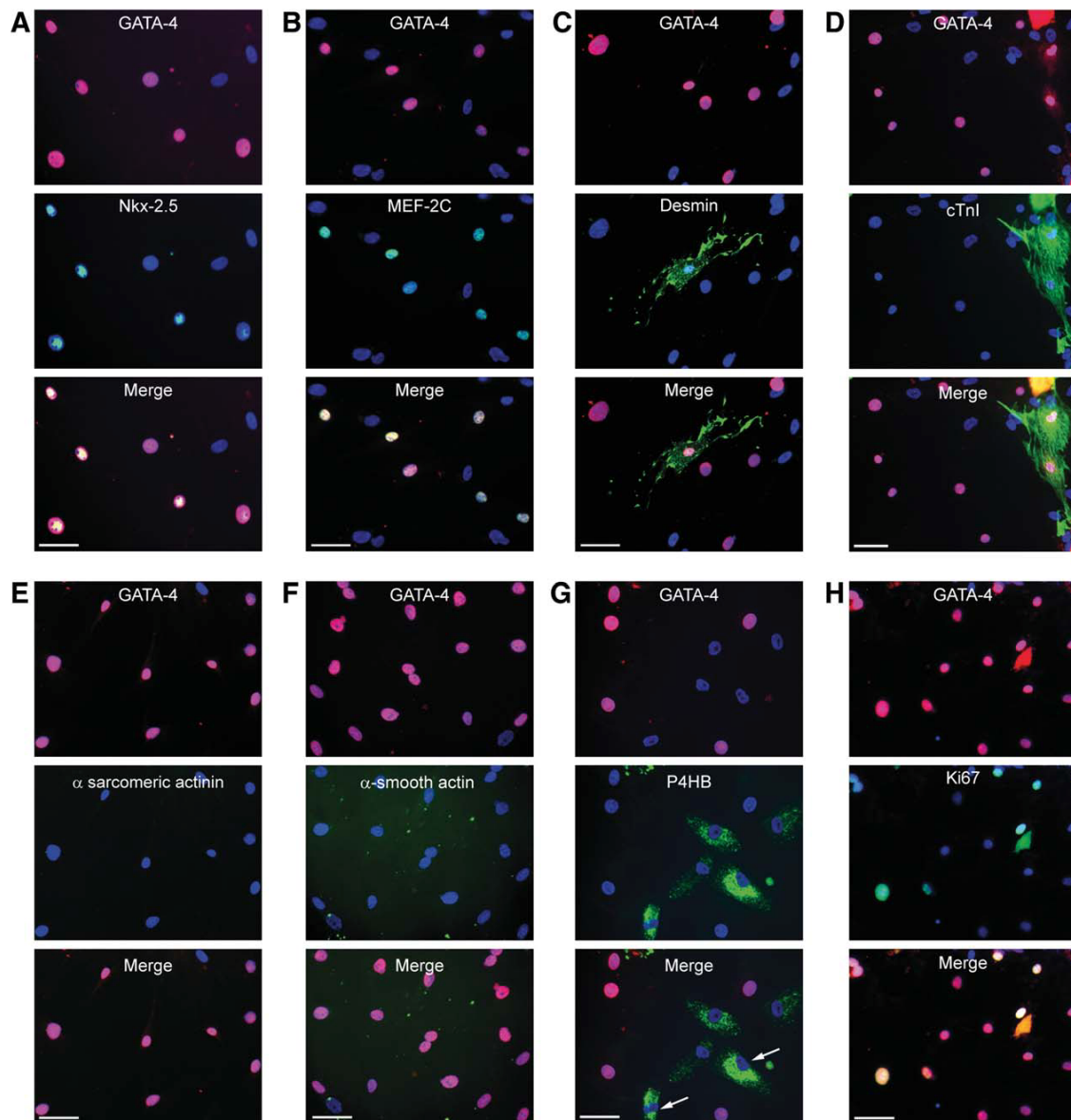


Figure 2. Phenotypic characterization of hybrid cells. Immunohistochemistry on day 7 of coculture showed that colony-derived GATA-4⁺ cells expressed (A) Nkx2.5 and (B) myocyte enhancer factor 2C but rarely (C) desmin and (D) cardiac troponin I and were negatively stained for (E) α -sarcomeric actinin, (F) α -smooth actinin, and (G) prolyl 4 hydroxylase subunit beta (P4HB) fibroblastic markers. Human multipotent adipose-derived stem cells were positive for P4HB staining (arrow). (H): Day 7 coculture-derived GATA-4⁺ cells also expressed Ki67. (A–H): Antibodies were conjugated with FITC (green), except for GATA-4, which was conjugated with Cy3 (red). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 50 μ m. Abbreviations: cTnI, cardiac troponin I; MEF-2C, myocyte enhancer factor 2C; P4HB, prolyl 4 hydroxylase subunit beta.

agreement with this finding, cardiac progenitor-like cells were GFP⁺, when coculture was performed with mouse GFP⁺ cardiomyocytes (Fig. 3D).

The mouse phenotype of hybrid cells highlighted that cellular fusion between stem cells and cardiomyocytes did not trigger cardiomyogenic conversion of stem cells but, rather, promoted somatic reprogramming of cardiomyocytes toward a progenitor-like state. To show that somatic reprogramming resulted from cell fusion, cocultures were performed with (i) a cell-culture insert to impede physical interactions between the two cell types without affecting the diffusion of soluble factors or (ii) living cardiomyocytes and hMADS cells previ-

ously killed with PFA to inhibit cellular fusion [40]. Indeed, PFA prefixation prevented fusion of live sperm cells or neural stem cells with fixed sea urchin eggs or endothelial cells, respectively, but did not disrupt receptor-mediated recognition and association of the cocultivated cell types [41, 42]. Reprogramming did not occur in either condition, which indicates that soluble signaling molecules or cell-to-cell interaction through a receptor had little or no effect on the generation of mouse cardiac progenitor-like cells (Fig. 3E, 3F and not shown).

Finally, we addressed the frequency of cardiomyocyte reprogramming by counting the number of immunostained cardiac β gal⁺/GATA-4⁺ hybrid cells resulting from cocultures

STEM CELLS

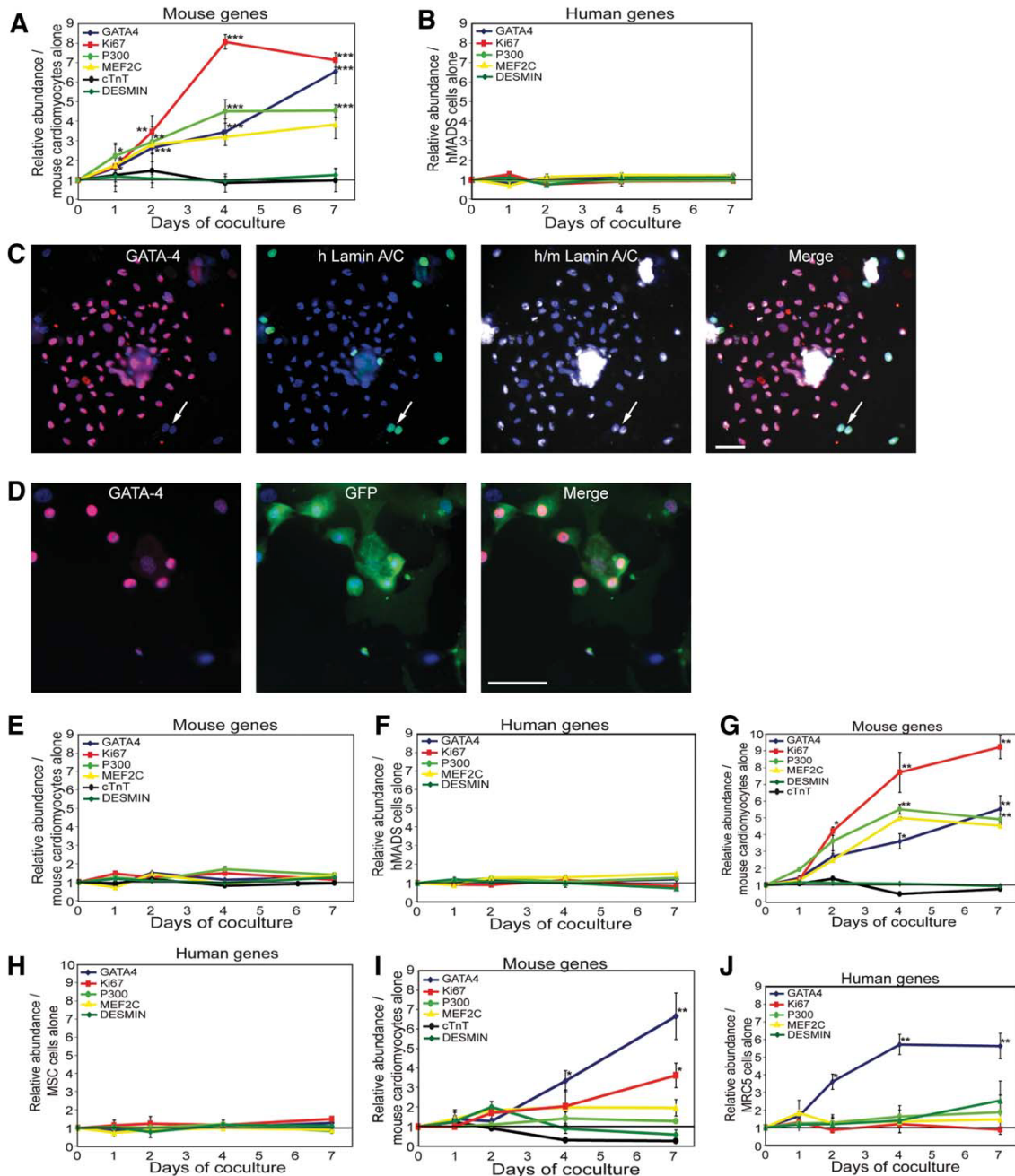


Figure 3. Cell-fusion induction of somatic reprogramming of mouse cardiomyocytes. (A, B): Mouse and human gene expression changes during coculture assessed by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) from day 0–7 of coculture. (C, D): Immunocytochemistry of mouse phenotype of colony GATA-4⁺ cells at day 7 of coculture. (C) A GATA-4⁺ (Cy3, red) colony expressing murine (Cy5, white) but not human (FITC, green) Lamin A/C. Arrow: human multipotent adipose-derived stem cells expressing human Lamin A/C but not GATA-4. (D): Coculture with GFP⁺ mouse cardiomyocytes leading to GATA-4⁺ (Cy3, red)/GFP⁺ (FITC, green) cells. (C, D): Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 50 μ m. (E, F): qRT-PCR showing no modification of mouse- or human-cardiac gene expression when human and mouse cells were separated by permeable membrane. (G–J): qRT-PCR analysis of mouse and human gene expression on coculture with (G, H) human bone marrow-derived stem cells or (I, J) human MRC5 fibroblasts. (A, B, E–J): Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$. Abbreviations: cTnT, cardiac troponin T; GFP, green fluorescent protein; h, human; h/m, human/mouse; hMADS cells, human multipotent adipose-derived stem cells; MEF-2C, myocyte enhancer factor 2C; MSC, mesenchymal stem cells.

rendered mitotically inactive by mitomycin C treatment. We detected a mean of 10 hybrid cells per 100,000 cardiomyocytes initially seeded. However, because propidium iodide staining and flow cytometry revealed that more than 90% of cardiomyo-

cytes were suffering before coculture (supporting information Fig. 2), the rate of cardiomyocytes efficiently reprogrammed might be about 0.1% when considering the fraction of healthy cardiomyocytes at the start of coculture.

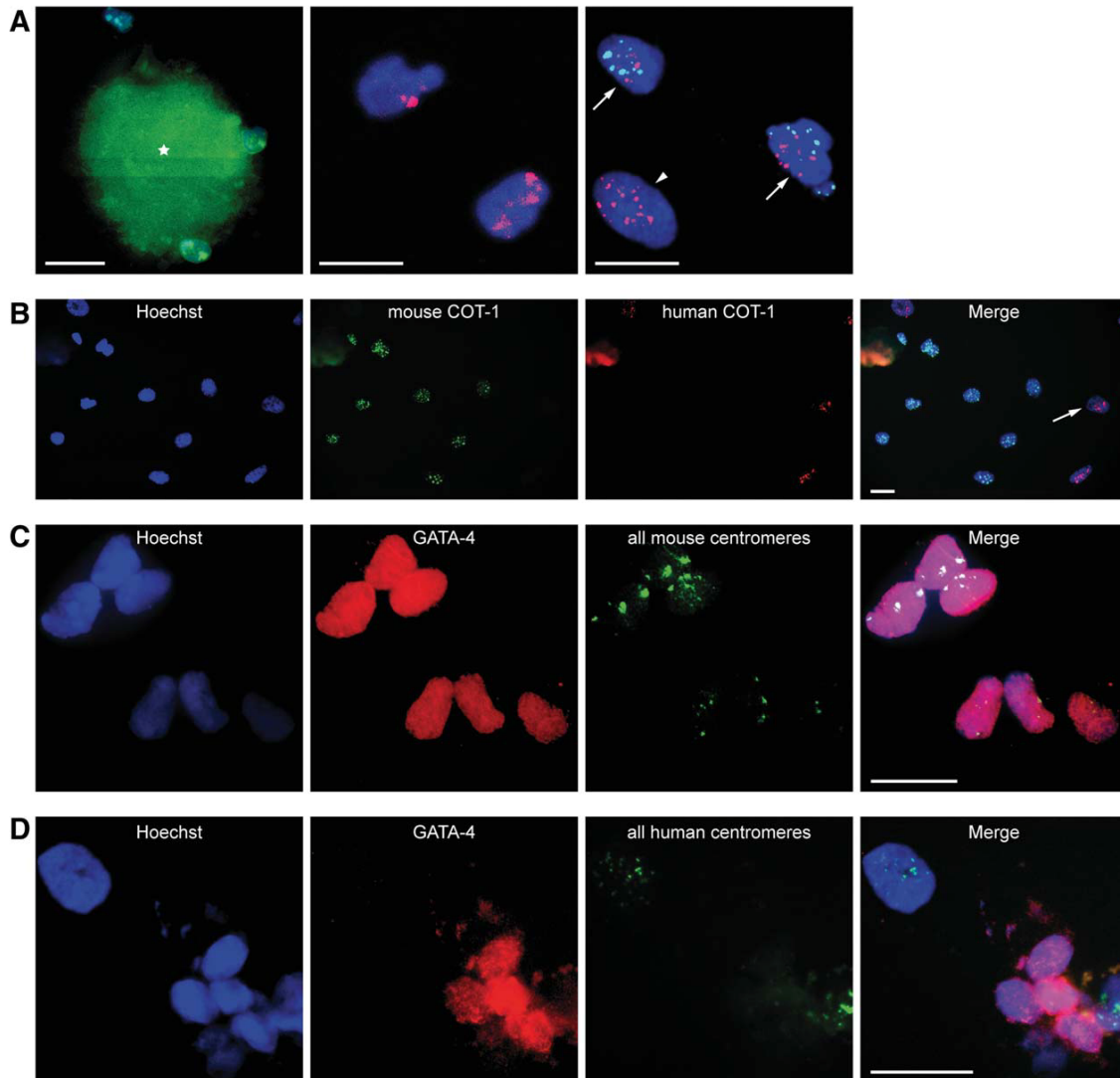


Figure 4. Analysis of nuclear fusion events during coculture. (**A, B**): Fluorescence in situ hybridization (FISH) with mouse (fluorescein isothiocyanate [FITC]) and human (Cy3) COT-1 DNA probes. (**A**): Right panel: detection of synkaryons containing human (red) and mouse (green) DNA (arrows) 2 days after coculture initiation. Arrowhead: human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells labeled with only human COT-1 probe. Left and middle panels: double FISH performed on mouse cardiomyocytes or hMADS cells alone, respectively. Star: cardiomyocyte body aggregate. (**B**): Nuclei of colony cells expressing mouse but not human COT-1 DNA. Arrow: human nucleus (red). (**C, D**): Immunocytochemistry on day 2 of coculture with GATA-4 combined with FISH labeling with FITC-conjugated human or mouse all centromere probes (green) confirmed that GATA-4⁺ nuclei (Cy3, red) contained (**C**) mouse but (**D**) not human DNA. Human nuclei devoid of GATA-4 staining are also shown. (**A–D**) Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 20 μ m.

In addition, we tried to improve reprogramming efficiency by increasing cardiomyocyte survival *in vitro* because living cardiomyocytes were found to have limited lifespan (<24 hours) under our coculture conditions. We performed cocultures on laminin-coated dishes in the presence of medium containing insulin-transferrin-selenium and 2,3butanedione monoxime as reported previously [43]. Nevertheless, under these conditions, the yield of reprogrammed cardiomyocytes seemed not affected.

hBMS Cells but Not Human Fibroblasts Can Reprogram Mature Cardiomyocytes

To determine whether reprogramming of cardiomyocytes was specific to hMADS cells, we created cocultures with hBMS cells

as another model of multipotent stem cells and with human fibroblasts (MRC5 cell line) as an example of proliferative cells devoid of plasticity potential. qRT-PCR of hBMS cell cocultures revealed results similar to those with hMADS cells: increased transcription of mouse but not human genes involved in proliferation and early cardiac commitment such as Ki67, GATA-4, MEF-2C, and p300, as well as unchanged expression of both mouse and human later cardiac differentiation genes such as desmin and cardiac troponin T (Fig. 3G, 3H). In contrast, coculture with MRC5 fibroblasts resulted in different mouse and human gene expression patterns. Even fibroblasts promoted enhanced transcription of mouse GATA-4; they failed to enhance that of mouse p300 and MEF-2C, which indicates that reprogramming of mouse cardiomyocytes was incomplete (Fig. 3I). On the other hand,

STEM CELLS

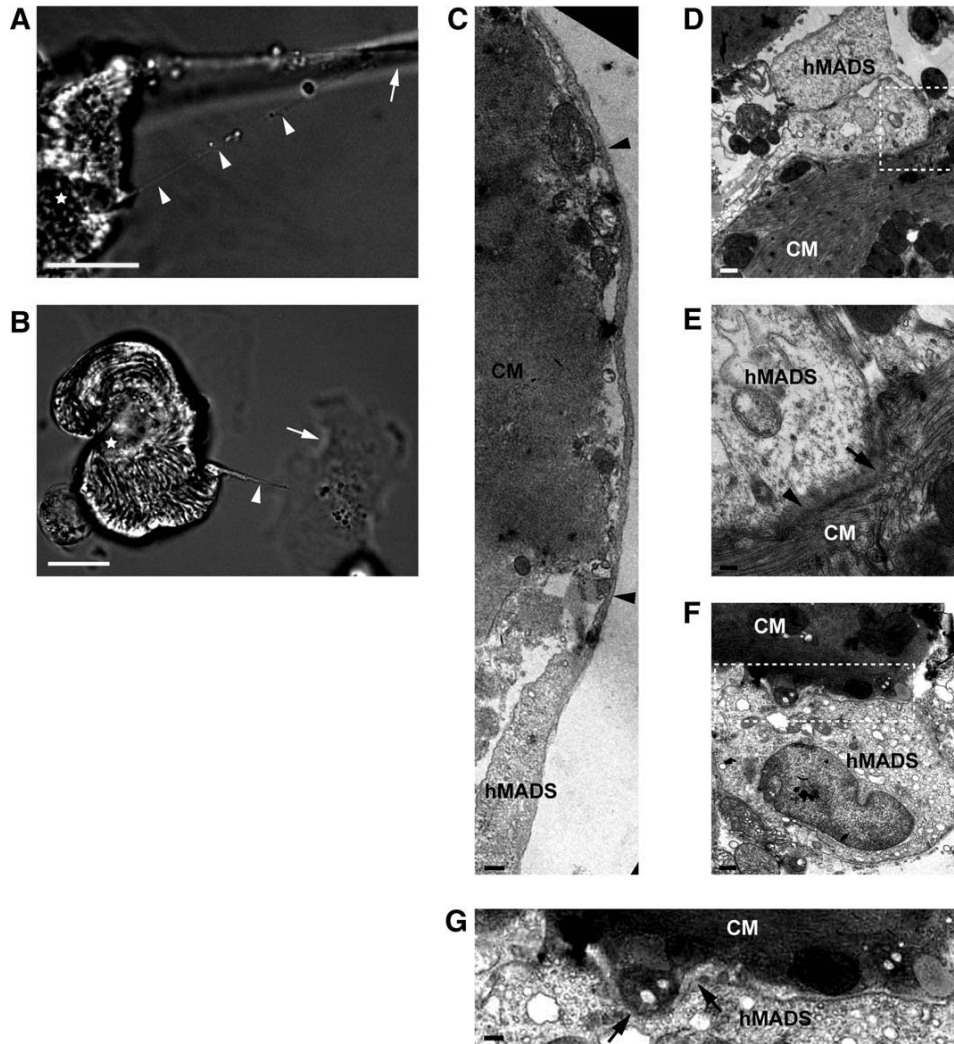


Figure 5. Occurrence of partial cell fusion events during coculture. (A, B): Live cell imaging at 6 hours after coculture initiation revealed thin membranous channels (arrowheads) connecting human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells (arrow) to cardiomyocytes (stars). Scale bar: 20 μm . (C–G): Electron microscopy images illustrating various types of intercellular interactions between hMADS cells and mouse cardiomyocytes in 24-hour cocultures. (C–E): Adherent long slender protrusions connecting hMADS cells to distant cardiomyocytes. (C): Partial view of a long hMADS cell protrusion surrounding a cardiomyocyte membrane (arrowheads). Scale bar: 378 nm. (D): Terminal portion of a protrusion. Scale bar: 644 nm. (E): Higher magnification of the contact area shown in (D) with blurring (arrowhead) and suspected focal loss (arrow) of the two plasma membranes. Scale bar: 275 nm. (F): Close membrane apposition between stem cells and cardiac cells. Scale bar: 863 nm. (G): Higher magnification of the contact site shown in (F) suggesting membrane disruption (arrows). Scale bar: 410 nm. Abbreviations: CM, cardiomyocytes.

coculture with human fibroblasts exhibited increased transcription of human GATA-4 gene, which suggests that these cells initiate a process of cardiomyogenic conversion (Fig. 3J). Accordingly, somatic reprogramming seems to be a feature of multipotent stem cells that is not shared by fibroblastic cells.

Cardiomyocyte Reprogramming Is Mainly Mediated by a Partial Cell-Fusion Process

To gain additional insights into the mechanisms underlying somatic reprogramming, we investigated whether hybrid cells originated from permanent or partial cell fusion processes. The occurrence of permanent cell fusion was tested by FISH nuclear staining with species-specific DNA probes. Rare synkaryons (1:200 hybrid cells) whose nuclei exhibited both human and mouse DNA were detected by this method (Fig.

4A), whereas colony-derived GATA-4⁺ cells contained only mouse DNA (Fig. 4B–4D). Such observations argued against permanent cell fusion as the principle mechanism of the formation of cardiac progenitor-like hybrid cells. Further supporting this hypothesis, live cell imaging and electron microscopy revealed partial cell fusion events between cocultured hMADS cells and cardiomyocytes. Live cell imaging microscopy revealed intercellular structures resembling tunneling nanotubes that ensure membrane continuity between stem cells and cardiac cells (Fig. 5A, 5B). Electron microscopy revealed two other types of heterocellular interactions: one connecting distant cells and consisting in long slender protrusions differing from nanotubes in that they adhered to the substratum [44] (Fig. 5C, 5D) and the other consisting in focal, broad, tight cell-to-cell contact between neighboring cells (Fig. 5F). Membrane disruptions suggestive of partial

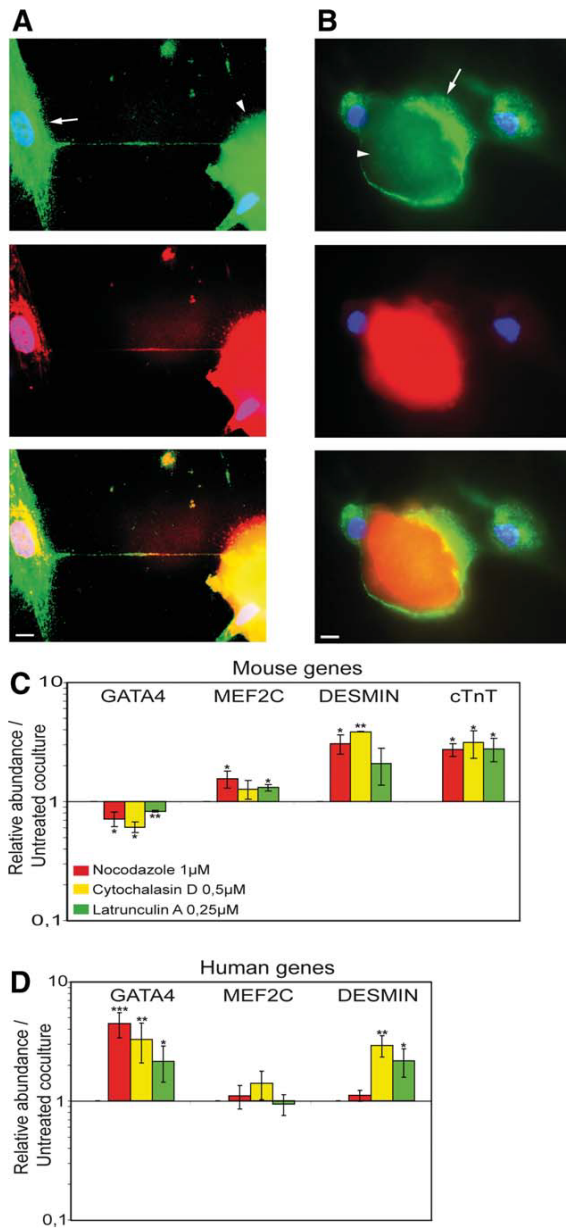


Figure 6. Involvement of f-actin and microtubule filaments in cardiomyocyte reprogramming. (A): Six hours after coculture initiation, thin membrane channels interconnecting stem (arrow) to cardiac (arrowhead) cells contained both f-actin (rhodamine-phalloidin staining, red) and microtubules (fluorescein isothiocyanate-conjugated α -tubulin, green). (B): Close membrane apposition between stem cells and cardiac cells showing concentration of microtubule (green) and f-actin (red) filaments at the contact site. Scale bar: 10 μ m (A, B). (C, D): Impaired somatic reprogramming by inhibitors of f-actin (cytochalasin D 0.5 μ M, latrunculin A 0.25 μ M) or microtubule polymerization (nocodazole 1 μ M) assessed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction at 7 days of coculture. No statistical differences between inhibitory effects of nocodazole, cytochalasin D, or latrunculin A were observed. Relative expression was compared with day 7 untreated cocultures. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$. Abbreviations: cTnT, cardiac troponin T; MEF-2C, myocyte enhancer factor 2C.

cell fusion seemed to occur focally in both cases (Fig. 5E, 5G). Cytoskeletal composition of intercellular structures connecting hMADS cells and cardiomyocytes was then analyzed by staining f-actin and microtubules with phalloidin and anti- α -tubulin antibody, respectively; most of the intercellular communications between the two cultivated cell types contained both microtubule and f-actin filaments (Fig. 6A, 6B).

To assess the involvement of such connections in somatic reprogramming, cocultured cells were transiently treated to not alter cell viability with cytochalasin D or latrunculin A, two inhibitors of f-actin polymerization, or with nocodazole, which inhibits α -tubulin polymerization. The expression of mouse and human cardiac genes was analyzed in day 7 cocultures by qRT-PCR. When compared with untreated cocultures, nocodazole-, cytochalasin D-, or latrunculin A-treated cocultures showed decreased transcriptional expression of mouse early cardiac GATA-4 gene with relative abundances of 0.7, 0.6, and 0.82, respectively. This effect was associated with increased expression of mouse later cardiac genes, with relative abundances of 3, 3.8, and 2 for desmin and 2.7, 3.1, and 2.8 for cardiac troponin T, respectively (Fig. 6C). This cardiac gene expression pattern being reminiscent of that of fully differentiated cardiomyocytes, these results indicated that transient disruption of f-actin filaments or microtubules prevented cardiomyocyte reprogramming back to a progenitor-like state. In addition, we observed an increased level of transcripts encoding for human GATA-4 and desmin, whereas the expression of human MEF-2C remained quite similar to that in untreated cocultures (Fig. 6D). These data indicated that transient disruption of f-actin or microtubule networks favored transdifferentiation of hMADS cells into a cardiac lineage. The phenotype of transdifferentiated hMADS cells was further characterized by immunohistochemistry. We detected the protein expression of GATA-4 but not desmin, cardiac troponin I, or MEF-2C, which supports that cardiomyogenic conversion of hMADS cells was incomplete (supporting information Fig. 3 and data not shown). Interestingly, the effect of nocodazole on mouse and human cardiac gene transcription was comparable with that of cytochalasin D and latrunculin A (no significant statistical differences between drugs) (Fig. 6C, 6D). Thus, f-actin and microtubules may act in concert and hence, somatic reprogramming might be mainly mediated by intercellular structures containing both f-actin and α -tubulin filaments.

Transfer of Functional Stem Cell Mitochondria into Cardiomyocytes Is Essential for Somatic Reprogramming

Because the transfer of functional mitochondria from stem cells was suggested to rescue cardiomyocytes in coculture [21], we analyzed whether mitochondria of hMADS cells labeled with mitotracker before coculture were transferred to mouse cardiomyocytes. As soon as 6 hours after coculture initiation, live cell imaging revealed some mouse cardiomyocytes containing fluorescent human mitochondria (Fig. 7A). Passive transfer of human mitochondria toward cardiomyocytes was tested in indirect cocultures in which hMADS cells previously labeled with mitotracker dye were separated from cardiomyocytes by an 8- μ m-pore cell-culture insert. Under these conditions, cardiomyocytes were unable to capture mitotracker dye from hMADS cells, which supports that stem cell mitochondria were mainly transferred through intercellular structures and not from extracellular medium (data not shown). Accordingly, human mitochondria were detected inside intercellular structures connecting hMADS cells to cardiomyocytes (Fig. 7B).

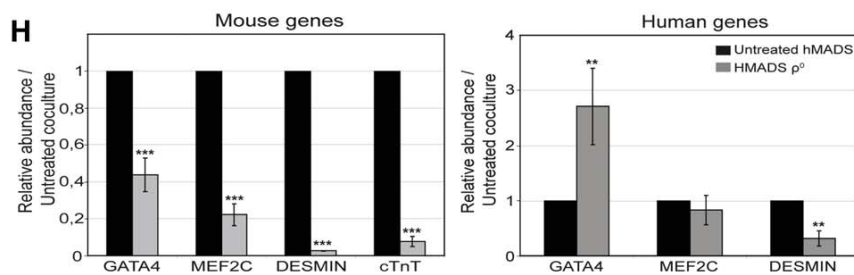
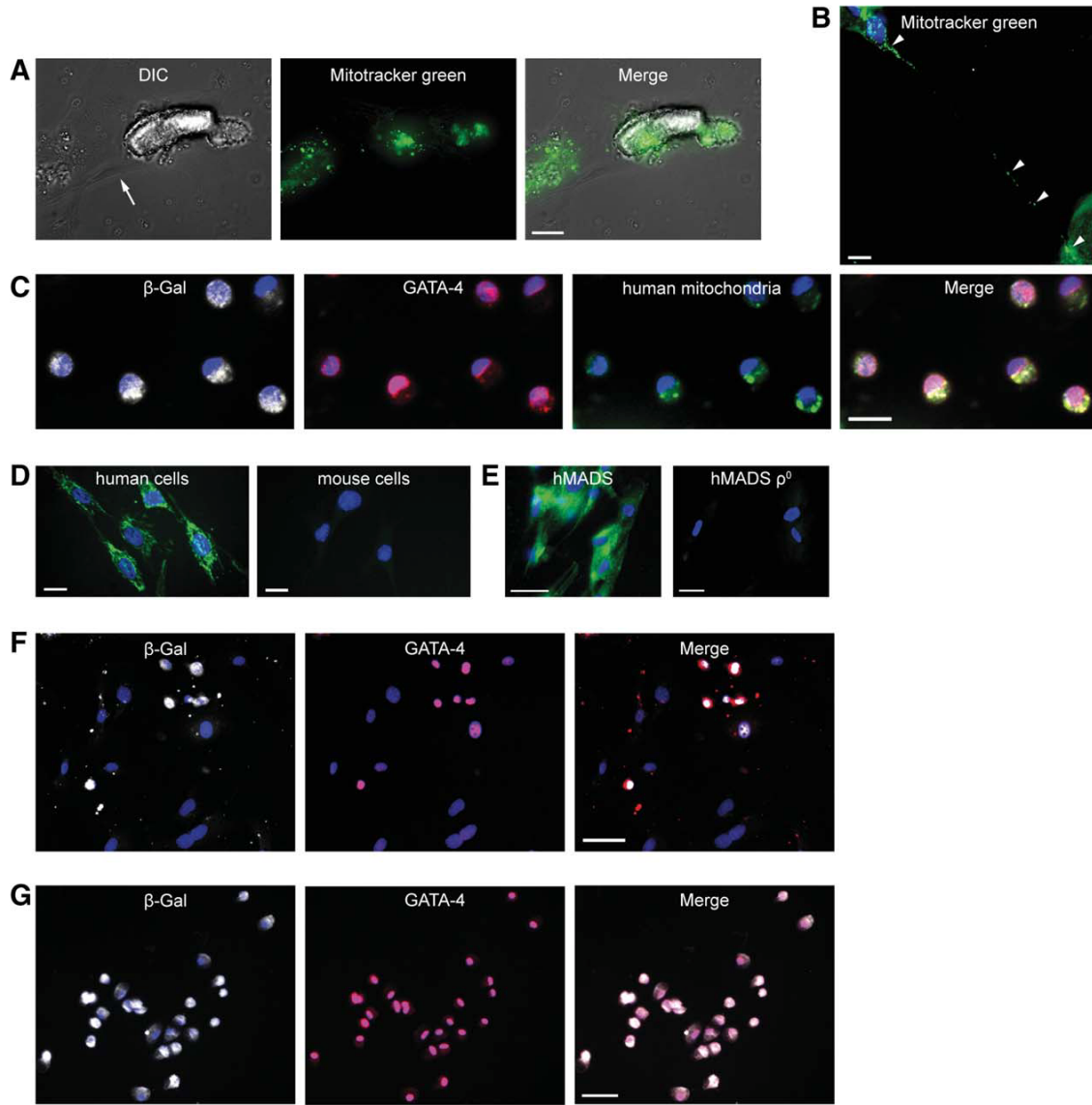


Figure 7. Role of functional stem cell mitochondria transfer toward cardiomyocytes for somatic reprogramming. **(A):** Microscopy live-cell imaging in a 6-hour coculture showing human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cell mitochondria (MitoTracker Green FM) in cardiomyocyte (arrowhead). Arrow points to an hMADS cell. **(B):** Presence of human mitochondria (MitoTracker Green FM) inside a tunneling nanotube-like structure connecting a stem cell to a cardiac cell and into cardiomyocyte cytoplasm (arrowhead; 12-hour coculture, PFA-fixed cells). **(C):** Despite their mouse phenotype, β -gal⁺ (Cy5, white)/GATA-4⁺ (Cy3, red) hybrid cells show human stem cell mitochondria in their cytoplasm (fluorescein isothiocyanate, green). **(D):** Human mitochondrial antibody used in **(C)** stained human but not mouse cells (left and right panels, respectively). **(E)** MitoTracker green staining showing mitochondrial DNA depletion in hMADS ρ^0 cells (ethidium bromide-treated, right panel) when compared with untreated hMADS cells (left panel). **(F)** Day 7 coculture of Cre-hMADS ρ^0 cells and Rosa26R mouse cardiomyocytes shows a marked decrease in number of β -gal⁺/GATA-4⁺ hybrid cells (Cy5, white, and Cy3 red staining, respectively) when compared with **(G)** untreated cocultures. Scale bar: 20 μ m (**A–E**), 50 μ m (**F**, **G**). **(H):** Real-time polymerase chain reaction assays showing human (right panel) and mouse (left panel) cardiac gene expression on coculture with hMADS ρ^0 cells when compared with untreated cocultures. Data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. **, $p < .01$; ***, $p < .001$. Abbreviations: cTnT, cardiac troponin T; DIC, differential interference contrast microscopy; MEF-2C, myocyte enhancer factor 2C.

To determine whether transferred human mitochondria persisted in mouse progenitor-like cells derived from cell fusion, day 7 cocultures of Rosa26R mouse cardiomyocytes and hMADS cells expressing Cre recombinase underwent immunocytochemistry for GATA-4, β -gal, and human mitochondria. Human mitochondria were revealed inside the cytoplasm of mouse-reprogrammed GATA-4⁺/ β -gal⁺ cells (Fig. 7C). As expected, the human mitochondria antibody stained human but not mouse cells (Fig. 7D).

To assess the role of stem cell mitochondria transfer in cardiomyocyte reprogramming, hMADS cells were pretreated for a long time (>1 month) with low doses of ethidium bromide. Such a treatment allows mutations and depletion of mitochondrial DNA without altering nuclear function, as reported previously for other cell types [32–34]. After 1 month of ethidium bromide exposure, more than 95% of treated cells, commonly designated as hMADS ρ^0 cells, exhibited greatly decreased mitochondrial DNA when compared with untreated hMADS cells (Fig. 7E). To investigate their cell fusion ability, hMADS ρ^0 cells were genetically modified to express Cre recombinase before coculture with Rosa26R mouse cardiomyocytes. The proportion of cardiac GATA-4⁺/ β -gal⁺ progenitor-like cells was 70–90% lower in treated (Fig. 7F) than untreated cocultures (Fig. 7G), indicating that functional stem cell mitochondria transfer is essential for successful achievement of somatic reprogramming. The detection of a low amount of fused cardiac progenitor-like cells was likely due to the presence in the hMADS ρ^0 cell population of a few human cells whose mitochondria were still unaltered. The requirement of functional stem cell mitochondria for reprogramming was confirmed by qRT-PCR analysis. When compared with untreated cocultures, hMADS ρ^0 cell cocultures showed significantly decreased mouse early but also late cardiac differentiation transcripts, with relative abundances of 0.43 for GATA-4, 0.22 for MEF-2C, 0.02 for desmin, and 0.07 for cTnT (Fig. 7H, left panel). The relative transcription level of mouse GATA-4 and MEF-2C genes should reflect the presence of a few cardiac hybrid cells previously identified by immunocytochemistry, whereas the marked decrease of mouse desmin and cTnT transcripts strongly suggests that in the absence of functional stem cell mitochondria, adult cardiomyocytes died, which explains why they were unable to be reprogrammed. Again, concomitant with somatic reprogramming inhibition, we observed enhanced transcription of human GATA-4 gene, with a relative abundance of 2.71 when compared with that in untreated cocultures, which suggests the entry of hMADS cells into the cardiomyogenic lineage (Fig. 7H, right panel).

DISCUSSION

To further characterize stem cell fusion as tissue repair mechanism, our study provides the first evidence that hMADS cells can rescue postmitotic cardiomyocytes *in vitro* via cell fusion and reprogramming to a rejuvenated progenitor-like state. Interestingly, hBMS cells but not human fibroblasts exhibited similar reprogramming ability, which suggests that this feature is restricted to some types of multipotent stem cells. Another important consideration concerns the frequency with which somatic reprogramming occurs. According to our results, the rate of this phenomenon is rare and might be underestimated because of the poor viability of cardiomyocytes after dissociation from the heart and their low survival potential on culture. Consequently, future efforts to optimize reprogramming effi-

ciency might focus on improving methods for dissociation from the heart and culture of mouse cardiomyocytes.

Additionally, our study reveals information on the phenotype of hybrid cardiac cells, which was until now largely unexplored. We found that fused cells are in fact an intermediate state between stem cells and fully differentiated cells because they look like a type of cardiac progenitor in terms of their proliferative potential, expression of early cardiac transcription factors and lack of contractile proteins. Therefore, whether such cells resemble or differ from cardiac progenitors or cardiac stem cells reported to reside in heart tissue [15, 45–47] remains a question that requires further knowledge of cardiac hybrid cells. In particular, whether coculture-derived hybrid cells can differentiate into beating cardiomyocytes needs to be determined to show whether they are truly cardiac progenitors. Although this phenomenon was never observed in our coculture conditions, we cannot exclude that such a differentiation could occur in experimental settings more faithfully reproducing the heart environment. In strengthening this hypothesis, recent unpublished data from our lab suggest that cardiac hybrid cells generated by coculture differentiate into mature cardiomyocytes *in vivo* when engrafted into mouse infarcted myocardium.

Besides assessing the hybrid phenotype, our study also provides insights into mechanisms underlying cell fusion processes leading to cardiomyocyte reprogramming. Despite the occurrence of permanent cell fusion during coculture, this process fails to fully explain the generation of hybrid cells in terms of its frequency, which is extremely rare, and the fact that we never detected colonies of synkaryons expressing GATA-4. Rather, our observations favor a role of partial cell fusion in the emergence of cardiac hybrid cells. Evidence of partial cell fusion events *in vitro* was reported from coculture of neonatal cardiomyocytes and endothelial progenitor cells or bone marrow-derived stem cells [21, 48]. These studies revealed thin membranous connections between stem cells and cardiac cells, but did not consider their cytoskeletal composition. Here, we report the possibility of partial cell fusion by transient thin channels resembling tunneling nanotubes or by close cell-to-cell membrane apposition accompanied by focal membrane disruption. Our results also highlight the involvement of both f-actin and microtubule filaments in this process. These two cytoskeletal components may act in concert inside the same intercellular connections. Interestingly, intercellular channels containing both f-actin and microtubules have been described to transfer mitochondria between macrophages *in vitro* [29] and, according to our observations, may also participate in conveyance of stem cell mitochondria toward cardiomyocytes.

Despite previous evidence of cell-to-cell connections and organelle transfer between stem cells and cardiac cells [20, 21], the formation of cardiac progenitor-like cells has never been reported in coculture studies. The fact is probably ascribable to differences in developmental stage of cardiomyocytes used for coculture. Indeed, other investigators used neonatal cardiac cells capable of division [7, 49, 50], whereas we used nonreplicative adult cardiomyocytes.

Finally, one of the most exciting outcomes of our study relates to the role of stem cell mitochondria in cardiomyocyte reprogramming. Here, we provide the first evidence to our knowledge that human stem cell mitochondria transferred toward mature cardiomyocytes persisted over time in mouse cardiac progenitor-like cells derived from cell fusion. Importantly, we found that depletion of stem cell mitochondrial DNA did not alter the cell fusion ability of stem cells but, rather, led to a dramatic decrease in somatic reprogramming frequency. Thus, delivery of stem cell intact mitochondria to distressed cardiomyocytes whose mitochondria are rapidly altered after isolation

STEM CELLS

may prolong the survival of such cells and maintain their nuclear integrity, which is a prerequisite for reprogramming.

In support of our findings, Spees et al. [34] recently described that transfer of stem cell mitochondria can rescue aerobic respiration in mammalian cells with nonfunctional mitochondria. However, whether stem cell mitochondria may affect somatic reprogramming by favoring cardiomyocyte transcriptional machinery remodeling through conveyance of key factors from stem cells or by modulating transcription factor activities into cardiomyocytes through mitochondria-to-nucleus retrograde signaling is yet unclear [51]. Whatever the fine mechanisms by which stem cell mitochondria sustain somatic reprogramming, these findings may reconcile current controversies about mechanisms underlying the cardiac benefit of stem cells by proposing an alternative regenerative pathway to other well-accepted candidates including transdifferentiation, permanent cell fusion, and paracrine effects. In particular, transfer of stem cell mitochondria may well explain why heart functional improvements are observed despite the fact that few of the donor cells are engrafted at long-term. Nevertheless, determining whether partial cell fusion, mitochondria transfer, and cardiomyocyte reprogramming take place *in vivo* is currently difficult. However, several recent studies have strengthened the hypothesis that such processes occur in living tissues. For instance, the existence of tunneling nanotubes has been confirmed in cornea following injury [52], and heart regeneration in zebrafish has been shown to be mediated by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation [53].

Future research into partial cell fusion will contribute to a better understanding of the regenerative properties of stem cells and lead to the development of more efficient cell therapies to treat heart degenerative diseases.

CONCLUSION

Our study provides the first evidence that adult stem cells can reprogram cardiomyocytes back to a more immature state through partial cell fusion processes and transfer of functional mitochondria. The timeline of cardiomyocyte reprogramming is summarized in supporting information Figure 4. In contrast, permanent cell fusion and the formation of synkaryons were rare in our coculture conditions and therefore do not seem to be the principle mechanisms of hybrid cardiac cell generation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M. Goossens, A. d'Anglemon de Tassigny, T. Piolot, and X. Decrouy for their helpful advice regarding FISH, cardiomyocyte dissociation, time-lapse videomicroscopy, and confocal microscopy experiments, respectively. This work was supported by INSERM, the Association Française contre les Myopathies, and the Association pour la Recherche et l'Etude des Maladies Cardiovasculaires.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interests.

REFERENCES

- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004;117:2971–2981.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615–2625.
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005;201:1397–1405.
- Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007;262:509–525.
- Kawada H, Fujita J, Kinjo K et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104:3581–3587.
- Rota M, Kajstura J, Hosoda T et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17783–17788.
- Yoon J, Shim WJ, Ro YM et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol* 2005;84:715–721.
- Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J et al. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50:280–289.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968–973.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542–545.
- Ying QL, Nichols J, Evans EP et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416:545–548.
- Ishikawa F, Shimazu H, Shultz LD et al. Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J* 2006;20:950–952.
- Dedja A, Zaglia T, Dall'Olmo L et al. Hybrid cardiomyocytes derived by cell fusion in heterotopic cardiac xenografts. *FASEB J* 2006;20:2534–2536.
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494–501.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12313–12318.
- Payne TR, Oshima H, Sakai T et al. Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. *Gene Ther* 2005;12:1264–1274.
- Spees JL, Whitney MJ, Sullivan DE et al. Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension. *FASEB J* 2008;22:1226–1236.
- Kajstura J, Rota M, Whang B et al. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005;96:127–137.
- Pijnappels DA, Schalij MJ, Ramkisoensing AA et al. Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. *Circ Res* 2008;103:167–176.
- Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J et al. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* 2005;96:1039–1041.
- Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in coculture. *J Cell Mol Med* 2008;12:1622–1631.
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I et al. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303:1007–1010.
- Gerdes HH, Carvalho RN. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:470–475.
- Levchenko A, Mehta BM, Niu X et al. Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1933–1938.
- Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E et al. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett* 2009;583:1481–1488.

- 26 Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Galkina SI et al. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp Cell Res* 2010;316:2447–2455.
- 27 Tavi P, Korhonen T, Hanninen SL et al. Myogenic skeletal muscle satellite cells communicate by tunnelling nanotubes. *J Cell Physiol* 2010;223:376–383.
- 28 Gousset K, Schiff E, Langevin C et al. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol* 2009;11:328–336.
- 29 Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK et al. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 2006;177:8476–8483.
- 30 Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 2008;10:211–219.
- 31 Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* 2010;31:270–278.
- 32 King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246:500–503.
- 33 Miller SW, Trimmer PA, Parker WD, Jr et al. Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with “neuronal-like” properties. *J Neurochem* 1996;67:1897–1907.
- 34 Spees JL, Olson SD, Whitney MJ et al. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1283–1288.
- 35 Mitra R, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol* 1985;249:H1056–H1060.
- 36 Okabe M, Ikawa M, Kominami K et al. ‘Green mice’ as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;407:313–319.
- 37 Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999;21:70–71.
- 38 Brown KE, Baxter J, Graf D et al. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* 1999;3:207–217.
- 39 Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T et al. Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol Cell Biol* 2003;23:3593–3606.
- 40 Yoon J, Choi SC, Park CY et al. Bone marrow-derived side population cells are capable of functional cardiomyogenic differentiation. *Mol Cells* 2008;25:216–223.
- 41 Wurmser AE, Nakashima K, Summers RG et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004;430:350–356.
- 42 Vacquier VD. The fertilizing capacity of sea urchin sperm rapidly decreases after induction of the acrosome reaction. *Dev Growth Differ* 1979;21:61–69.
- 43 Sambrano GR, Fraser I, Han H et al. Navigating the signalling network in mouse cardiac myocytes. *Nature* 2002;420:712–714.
- 44 Gurke S, Barroso JF, Gerdes HH. The art of cellular communication: Tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem Cell Biol* 2008;129:539–550.
- 45 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763–776.
- 46 Dawn B, Stein AB, Urbanek K et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3766–3771.
- 47 Messina E, De Angelis L, Frati G et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911–921.
- 48 Cselenyak A, Pankotai E, Horvath EM et al. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol* 2010;11:29.
- 49 Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N et al. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:2017–2024.
- 50 Rose RA, Jiang H, Wang X et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells* 2008;26:2884–2892.
- 51 Liu Z, Butow RA. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 2006;40:159–185.
- 52 Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: A feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol* 2008;180:5779–5783.
- 53 Jopling C, Sleep E, Raya M et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010;464:606–609.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

La thérapie cellulaire régénératrice offre des perspectives d'applications dans de nombreuses pathologies entraînant une perte cellulaire. Cependant, suite à un infarctus du myocarde et donc une diminution importante du nombre de cardiomyocytes, l'injection de cellules souches n'a permis de mettre en évidence qu'une amélioration légère et transitoire de la fonction cardiaque. Ces résultats suggèrent qu'il est nécessaire d'améliorer l'efficacité des protocoles de thérapie cellulaire cardiaque. Cette amélioration passe par une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu par les cellules souches dans la régénération myocardique. Parmi les hypothèses soulevées, la fusion entre les cellules souches et les cardiomyocytes a été décrite dans plusieurs études mais le rôle physiologique de ce phénomène reste inconnu. Mon travail de thèse a consisté à étudier ce mécanisme *in vitro* au sein de cocultures entre des cellules souches adultes humaines (cellules hMADS pour human multipotent adipose derived stem cells) et des cardiomyocytes murins adultes. Nous avons pu mettre en évidence un processus de fusion hétérologue entre ces deux types cellulaires, aboutissant à la reprogrammation du cardiomyocyte vers un stade de progéniteur. Les cellules hybrides résultant de cette fusion ont exprimé des marqueurs cardiomyogéniques précoces et de prolifération et ont été montrées comme ayant un génotype exclusivement murin. Ces cellules hybrides ou progéniteurs cardiaques se sont formés préférentiellement par un mécanisme de fusion partielle par l'intermédiaire de structures intercellulaires appelées nanotubes composés de f-actine et de microtubules. En outre, nous avons montré que le transfert de mitochondries des cellules souches vers les cardiomyocytes était indispensable pour la reprogrammation des cardiomyocytes. En conclusion, nos résultats apportent de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes de régénération médiés par les cellules souches qui est un pré-requis pour optimiser les protocoles de thérapie cellulaire cardiaque.

Regenerative cell therapy offers potential applications in many diseases involving cell loss. However, following myocardial infarction and the dramatic decrease in the number of cardiomyocytes, the injection of stem cells led to a poor and transient improvement of cardiac function. Therefore stem cell-based therapy to treat myocardial infarction requires a better understanding of the mechanisms brought into play by stem cells in heart regeneration. Among the different hypothesis raised, cell fusion between stem cells and cardiomyocytes has been described in several studies. However, the respective physiological impact of cell fusion remains unknown. During my thesis, I investigated this cell fusion mechanism *in vitro* in a coculture model between human multipotent adipose-derived stem cells (hMADS) and murine fully differentiated cardiomyocytes. We showed intercellular exchanges of cytoplasmic and nuclear material between both cell types, followed by a heterologous cell fusion process promoting cardiomyocyte reprogramming back to a progenitor-like state. The resulting hybrid cells expressed early cardiac commitment and proliferation markers and exhibited a mouse genotype. We provided evidence that cardiac hybrid cells were preferentially generated through partial cell fusion mediated by intercellular structures composed of f-actin and microtubule filaments. Furthermore, we showed that stem cell mitochondria were transferred into cardiomyocytes and were required for somatic cell reprogramming. In conclusion, by providing new insights into previously reported cell fusion processes, our results might contribute to a better understanding of stem cell-mediated regenerative mechanisms and thus, the development of more efficient stem cell-based heart therapies.