

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**THERAPIE CELLULAIRE CARDIAQUE :
INSTABILITE ELECTRIQUE DU MYOCARDE APRES
GREFFE DE MYOBLASTES AUTOLOGUES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie de Nantes

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Sarah FERNANDES

Le 22 décembre 2006 devant le jury ci-dessous

Président du jury :	M. TROCHU Jean-Noël	Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs :	M. MOULY Vincent	Chargé de Recherche, Université de Paris VI
	M. VAN BELLE Eric	Professeur, Université de Lille
Examineurs :	M. AGBULUT Onnik	Maître de Conférence, Université de Paris VII
	M. BERDEAUX Alain	Professeur, Université de Paris XII
	M. CHARPENTIER Flavien	Chargé de Recherche, Université de Nantes
Directeur de thèse	M ^{me} LEMARCHAND Patricia	Professeur, Université de Nantes

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
I. L'INSUFFISANCE CARDIAQUE SECONDAIRE A L'INFARCTUS DU MYOCARDE : UN PROBLEME MAJEUR DE SANTE PUBLIQUE	5
II. LES THERAPEUTIQUES ACTUELLES	5
III. LA THERAPIE CELLULAIRE COMME TRAITEMENT DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE ...	6
IV. LA GREFFE DE MYOBLASTES SQUELETTIQUES	11
A. <i>Description</i>	11
B. <i>Avantages pour la thérapie cellulaire cardiaque</i>	12
C. <i>Les études précliniques</i>	13
(a) Faisabilité de la transplantation intramyocardique de myoblastes	13
(b) Amélioration de la fonction cardiaque	13
(c) Phénotype des cellules transplantées	14
V. LES PREMIERS ESSAIS CLINIQUES	17
VI. TROUBLES DU RYTHME ET TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES : <i>HISTOIRE</i> <i>NATURELLE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE OU EFFETS INDESIRABLES ?</i>	23
VII. LES CONNEXINES	25
BUTS DE LA THESE	28
METHODOLOGIE	30
I. CHOIX DU MODELE	30
II. MISE AU POINT DES MODELES BIOLOGIQUES	32
A. <i>Modèle chirurgical</i>	32
B. <i>Culture cellulaire</i>	34
1. Culture primaire de myoblastes	34
2. Cellules mononucléées de la moelle	35

C.	<i>Injections intramyocardiques</i>	36
1.	Chez le rat sain	36
2.	Après ligature coronaire	36
III.	ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	38
A.	<i>In vivo</i>	39
1.	Stimulations ventriculaires programmées	39
(a)	Mise au point.....	39
(b)	Protocole de Stimulations Ventriculaires Programmées	40
2.	Télémétrie	43
B.	<i>Ex vivo : mesure des potentiels d'action monophasiques en intra-mural</i>	44
IV.	TRANSDUCTION PAR LE LENTIVIRUS	45
V.	PCR EN TEMPS REEL : LA TECHNOLOGIE TAQMAN	45
A.	<i>La chimie du TaqMan</i>	45
B.	<i>La méthode de quantification</i>	48
C.	<i>Evaluation de l'expression de la Cx43 transduite</i>	49
1.	<i>In vitro</i>	49
2.	<i>In vivo</i> : étape de préamplification	50

**ETUDE I : EVALUATION DE LA STABILITE ELECTRIQUE DU MYOCARDE
APRES GREFFE DE MYOBLASTES AUTOLOGUES..... 52**

I.	INTRODUCTION.....	52
II.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	53
III.	RESULTATS	54
IV.	COMMENTAIRES	54

**ETUDE II : GREFFE DE MYOBLASTES AUTOLOGUES SUREXPRIMANTS
LA CONNEXINE 43 : IMPACT SUR LA STABILITE ELECTRIQUE DU MYOCARDE
..... 56**

I.	INTRODUCTION.....	56
----	-------------------	----

II.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	58
III.	RESULTATS	58
IV.	COMMENTAIRES	60
DISCUSSION GENERALE		63
I.	IMPORTANCE DES METHODES D'EVALUATION DES ARYTHMIES	64
II.	LES MYOBLASTES : UN SUBSTRAT ARYTHMOGENE	66
III.	SUREXPRESSION DE LA CX43	68
BIBLIOGRAPHIE.....		72
ANNEXE.....		82

TABLE DES FIGURES

Figure 1 :	Représentation schématique d'une jonction communicante	26
Figure 2 :	Coupes transversales de myocarde (rat et souris)	31
Figure 3 :	Protocole de culture et de transplantation des myoblastes.....	32
Figure 4 :	Pourcentage de myoblastes au niveau des cultures primaires	35
Figure 5 :	Myocardes injectés avec vecteurs synthétiques complexés avec un plasmide codant pour la β -galactosidase	36
Figure 6 :	Localisation et survie des cellules injectées	37
Figure 7 :	Pose d'une électrode épiscopardique : vue opératoire	41
Figure 8 :	Exemple d'ECG enregistré lors d'une Stimulation Ventriculaire Programmée.....	42
Figure 9 :	Mesure des ondes P, QRS et des intervalles PR, QT, RR.....	43
Figure 10 :	Enregistrement des potentiels d'action monophasiques.....	44
Figure 11 :	Spectre d'émission et d'absorption d'une sonde TaqMan.....	46
Figure 12 :	Les 3 étapes de la chimie TaqMan.....	47
Figure 13 :	Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$	49
Figure 14 :	Séquence codante pour le Wpre.....	50
Figure 15 :	Protocoles de RT-PCR avec ou sans pré-amplification.....	51
Figure 16 :	Protocole expérimental utilisé.....	53
Figure 17 :	Potentiels d'action monophasique enregistrés en intramural.....	59
Figure 18 :	Arythmies déclenchées lors des protocoles de SVP.	60

INTRODUCTION

I. L'INSUFFISANCE CARDIAQUE SECONDAIRE A L'INFARCTUS DU MYOCARDE : UN PROBLEME MAJEUR DE SANTE PUBLIQUE

L'insuffisance cardiaque secondaire à un infarctus du myocarde (IM) est un défi majeur des années à venir. En effet, elle atteint actuellement plusieurs millions de patients. Cette maladie représentera au XXI^{ème} siècle la première cause de morbi-mortalité (Delahaye *et al.*, 1998; Berry *et al.*, 2001). L'augmentation de l'incidence et la prévalence de l'insuffisance cardiaque dans les pays développés est due au vieillissement de la population, aux changements de mode de vie mais également à une meilleure prise en charge médicale des patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde améliorant de ce fait leur pronostic vital. Même si la prévalence de l'insuffisance cardiaque a diminué chez les femmes (probablement grâce à un meilleur diagnostic et à une meilleure prise en charge de l'hypertension artérielle), chez les hommes la diminution de la mortalité secondaire à un infarctus du myocarde a induit une augmentation de la prévalence de l'insuffisance cardiaque.

Ainsi, depuis ces 10 dernières années le taux d'hospitalisation des patients insuffisants cardiaques a presque doublé. Aujourd'hui la prise en charge pharmacologique et hospitalière de l'insuffisance cardiaque représente 1 à 2 % des dépenses de santé publique dans les pays occidentaux (Delahaye *et al.*, 1998). La prévalence de l'insuffisance cardiaque est d'environ 225 patients/million avec une mortalité annuelle de 35%.

II. LES THERAPEUTIQUES ACTUELLES

Actuellement le traitement de la majorité des patients est uniquement pharmacologique. Cependant, en dépit des progrès majeurs réalisés dans le domaine pharmacologique, ce traitement permet seulement de ralentir l'évolution de

l'insuffisance cardiaque des patients, mais ne permet en aucun cas l'amélioration de la contraction ventriculaire des patients.

La transplantation cardiaque reste le traitement le plus efficace des formes les plus avancées de l'insuffisance cardiaque. Cependant, cette approche reste limitée par le faible nombre de greffons disponibles, par les nombreuses complications (notamment immunologiques), et par le statut clinique du patient.

Diverses approches chirurgicales alternatives à la transplantation cardiaque sont en cours de développement ; la plupart de ces techniques visent à modifier la forme du ventricule dilaté. Les dispositifs d'assistance ventriculaire permettent essentiellement d'améliorer la survie des patients en attente d'une greffe cardiaque et le développement de pompes implantables à demeure n'est actuellement qu'une voie d'investigation (Rose *et al.*, 2001). Tout comme la transplantation cardiaque, toutes ces approches chirurgicales, alternatives aux traitements pharmacologiques, sont extrêmement agressives, et sont de ce fait très sélectives. Il reste donc un large espace pour toute autre thérapie visant à améliorer le pronostic. Dans ce contexte, la thérapie cellulaire apparaît comme une stratégie prometteuse pour les patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

III. LA THÉRAPIE CELLULAIRE COMME TRAITEMENT DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

Le concept de la thérapie cellulaire a été développé depuis une dizaine d'années par de nombreuses équipes associant cliniciens et biologistes (Dowell *et al.*, 2003). Les objectifs de la thérapie cellulaire sont multiples et non exclusifs. La transplantation cellulaire doit aboutir de manière directe ou indirecte à la formation d'un tissu ayant une fonctionnalité supérieure à celle de la zone lésée. Ainsi, un protocole de thérapie cellulaire cardiaque efficace, permettrait de remplacer le tissu cicatriciel par un tissu contractile, de manière à ralentir ou inverser le remodelage, ou à en changer la nature. Dans l'idéal cette stratégie thérapeutique pourrait restaurer la contractilité myocardique et/ou encore induire un processus d'angiogénèse locale afin de stimuler les cardiomyocytes hibernants.

Les cardiomyocytes : 1^{ère} source pour la transplantation cellulaire cardiaque

La 1^{ère} approche pour le traitement d'une perte massive de cardiomyocytes suite à un épisode ischémique du myocarde a été la transplantation de nouveaux cardiomyocytes au niveau du tissu myocardique lésé. Les cardiomyocytes adultes ne proliférant pas *in vitro*, des cellules fœtales ou néonatales ont été utilisées pour les expériences de thérapie cellulaire cardiaque. Ces études précliniques ont ainsi montré qu'une fois injectés au sein d'un myocarde sain ou lésé, les cardiomyocytes fœtaux ou néonataux ont les capacités de coloniser le tissu myocardique hôte (Scorsin *et al.*, 1996), puis de se différencier en cellules ayant toutes les caractéristiques physiologiques des cardiomyocytes adultes (Leor *et al.*, 1996). Une fois différenciées ces nouvelles cellules transplantées peuvent former des jonctions communicantes avec les cardiomyocytes hôtes (Soonpaa *et al.*, 1994; Koh *et al.*, 1995). De plus le couplage électromécanique entre les cellules hôtes et les cellules transplantées est totalement fonctionnel (Rubart *et al.*, 2003). Les cardiomyocytes fœtaux ou néonataux sont donc capables de former un nouveau syncytium fonctionnel avec les cardiomyocytes hôtes. La faisabilité et l'efficacité de la transplantation de cardiomyocytes fœtaux ou néonataux dans des modèles d'insuffisance cardiaque ont été décrites dans de nombreuses études dont les principales ont été référencées par Dowell *et al.* (Dowell *et al.*, 2003).

Cependant, différents obstacles rendent difficile l'utilisation de telles cellules pour des protocoles cliniques. Tout d'abord des problèmes d'ordre immunologique (il s'agirait d'allogreffes), puis quantitatif (le nombre de cellules fœtales nécessaires pour une transplantation efficace d'un myocarde adulte est bien trop important par rapport aux quantités de cellules disponibles) et enfin éthique (il serait nécessaire d'utiliser des cellules d'origine fœtale).

Les biologistes et les cliniciens ont donc cherché une autre source cellulaire, capable de restaurer une fonction contractile du myocarde et plus à même d'être utilisée en clinique. Les cellules transplantées doivent être le moins immunogéniques possibles afin de limiter l'immunosuppression qui non seulement

augmente le risque d'infection mais en plus a des effets secondaires indésirables à long terme.

Théoriquement, de nombreux types cellulaires pourraient être utilisés. Chacun des types cellulaires présente des limites importantes dans leur utilisation (tableau I).

Les cellules de la moelle osseuse (dont les cellules souches hématopoïétiques (Makino *et al.*, 1999) et les cellules souches mésenchymateuses (Barbash *et al.*, 2003)), des cellules du tissu adipeux (Planat-Benard *et al.*, 2004) et du myocarde lui-même (Beltrami *et al.*, 2003) ont montré une capacité de transdifférenciation en cardiomyocytes et en cellules endothéliales. L'intérêt mais aussi la complexité de la moelle osseuse reposent sur le fait que la moelle contient de multiples sous-populations cellulaires avec des rôles potentiellement différents et complémentaires, mais dont on connaît encore mal les régulations. Les travaux expérimentaux avec la moelle osseuse ont été réalisés majoritairement chez le petit animal, et font l'objet d'une vive controverse dans la littérature, certaines équipes n'ayant pu confirmer les premiers résultats spectaculaires obtenus chez la souris par Anversa *et al.* (Orlic *et al.*, 2001). L'hypothèse actuelle est que les cellules de la moelle osseuse, une fois injectées, auraient un rôle multiple à la fois d'incorporation et de différenciation pour un faible nombre d'entre elles, mais aussi d'apport de facteurs de croissance et de "soutien" au tissu myocardique sénescant (Dimmeler *et al.*, 2005). Malgré l'absence de preuve irréfutable et reproductible de transdifférenciation de ces cellules souches, des essais cliniques ont été démarrés dans les années 2000, utilisant les cellules de la moelle osseuse.

Les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes et *in vitro* sont capables de proliférer indéfiniment. Plusieurs équipes ont montré la faisabilité de greffes des cellules souches embryonnaires dans des modèles animaux d'infarctus du myocarde (Hodgson *et al.*, 2004). Même si la transplantation de cellules souches embryonnaires n'est pas une option thérapeutique pour le futur immédiat (Davani *et al.*, 2005), il est probable que les recherches en cours permettront d'identifier les voies moléculaires responsables de la différenciation en cardiomyocytes, permettant à leur tour la manipulation d'autres sources cellulaires pour la réparation myocardique, plus acceptables en clinique humaine.

Parmi ces sources cellulaires, les myoblastes, c'est à dire les précurseurs des cellules contractiles du muscle squelettique, sont les seules cellules présentes chez l'adulte à être capables de développer spontanément un appareil contractile fonctionnel. De ce fait, après les cardiomyocytes, les myoblastes semblaient être la source cellulaire la plus appropriée pour restaurer une fonction contractile au niveau d'un tissu myocardique lésé.

Table I : Source de cellules candidates pour la thérapie cellulaire cardiaque

Cellules potentielles	Avantages	Inconvénients	Etudes réalisées	
			Pré-cliniques	Cliniques
Cardiomyocytes	Possibilité de recréer un tissu à l'identique	Difficulté d'obtention des cellules en grande quantité	+	-
Myoblastes	Transplantation autologue Pas de problème d'histocompatibilité Cellules contractiles	Risque arythmogène Pas de transdifférenciation en cardiomyocytes	+	+
Cellules souches embryonnaires	Prolifération indéfinie (<i>in vitro</i>) Capacité de différenciation	Problèmes d'histocompatibilités Problèmes éthiques Risques de tumeurs	+	-
Cellules mononucléées de la moelle osseuse	Transplantation autologue Pas de problème d'histocompatibilité	Sous-populations cellulaires mal caractérisées	+	+
Cellules souches mésenchymateuses	Transplantation autologue Pas de problème d'histocompatibilité	Culture <i>in vitro</i> nécessaire pour isolement et expansion Sous-populations cellulaires mal caractérisées	+	+
Cellules souches hématopoïétiques	Transplantation autologue Pas de problème d'histocompatibilité	Transdifférenciation en cardiomyocytes incertaine	+	-
Cellules souches du tissu adipeux	Transplantation autologue Pas de problème d'histocompatibilité Tissu adipeux présent en grande quantité et pouvant être facilement prélevé	Isolement difficile Culture <i>in vitro</i> nécessaire pour isolement et expansion	+	-
Cellules souches du myocarde	Transplantation autologue Pas de problème d'histocompatibilité Possibilité de recréer un tissu à l'identique	Découverte récente devant être approfondie Isolement difficile Culture <i>in vitro</i> nécessaire pour isolement et expansion	+	-

IV. LA GREFFE DE MYOBLASTES SQUELETTIQUES

Les cellules satellites sont les précurseurs des cellules musculaires squelettiques qui lorsqu'elles sont issues de culture *in vitro* prennent alors le nom de « myoblastes ». *In vivo* les cellules satellites ont des capacités d'autorenouvellement et de différenciation permettant la réparation de fibres musculaires lésées. De ce fait elles sont considérées comme les cellules « souches » du muscle squelettique (Zammit and Beauchamp, 2001; Negroni *et al.*, 2006). Les cellules satellites sont étudiées depuis plusieurs dizaines d'années comme source cellulaire candidate pour la régénération musculaire *in vivo* dans les cas de pathologies telles que les dystrophies musculaires (Skuk *et al.*, 2004). Les propriétés biologiques de ces cellules, leurs caractères phénotypiques sont actuellement bien connus et les protocoles de culture cellulaire permettant leur expansion *in vitro* sont eux aussi bien définis. Il a donc été proposé d'utiliser ces cellules musculaires immatures dans l'espoir de régénérer la capacité contractile d'un tissu myocardique endommagé.

A. Description

Les cellules satellites du muscle squelettique ont été décrites pour la première fois en 1961 par Katz et Mauro (Mauro, 1961). A l'état basal ces cellules satellites demeurent quiescentes sous la membrane basale des fibres musculaires striées squelettiques (Mauro, 1961). Elles peuvent être caractérisées entre autre par l'expression de certaines protéines spécifiques comme la M-cadherine, N-CAM (aka CD56 ou Leu19), CD34, c-Met, MNF, Myf5 ou Pax7 (pour revue voir (Negroni *et al.*, 2006)). Sous le coup d'une lésion traumatique, chimique ou génétique, les fibres musculaires peuvent être partiellement détruites. Leur dégénérescence entraîne l'activation des cellules satellites (Bischoff and Heintz, 1994; Morgan and Partridge, 2003). Une fois activées ces cellules satellites prolifèrent, se différencient entraînant la formation de fibres musculaires puis la réparation du tissu musculaire endommagé. Ainsi, à tout âge et dans toutes les espèces, le muscle squelettique

endommagé peut se régénérer à la fois par réparation des fibres restantes et par formation de nouvelles fibres à partir de ces cellules satellites.

La dissection des cellules musculaires *in vitro*, telle qu'elle est pratiquée lors de la mise en culture d'une biopsie musculaire en vue d'un protocole de thérapie cellulaire, active ces mécanismes de prolifération et de différenciation permettant la préparation d'une grande quantité de myoblastes.

B. Avantages pour la thérapie cellulaire cardiaque

Comme il a été décrit précédemment, les myoblastes ont une grande capacité à se multiplier *in vitro*. Ainsi, chez l'homme, après mise en culture d'environ 10g de biopsie musculaire, il est possible d'obtenir plus de 10^9 cellules, quantité suffisante pour réaliser une transplantation intramyocardique (Smits *et al.*, 2003). Cette biopsie peut être réalisée sous anesthésie locale, chez des patients en phase aigüe d'infarctus du myocarde tout comme chez des patients avec une insuffisance cardiaque avancée. De ce fait les transplantations autologues sont facilement réalisables, ce qui permet d'éviter les problèmes éthiques, les problèmes de disponibilité des donneurs ainsi que les traitements immuno-suppresseurs. De plus, les myoblastes étant des cellules déjà différenciées et destinées à devenir des fibres musculaires, le risque de formation de tumeur est absent (van den Bos *et al.*, 2004). La grande résistance de ces cellules à des situations ischémiques encourage leur utilisation en thérapie cellulaire cardiaque : les myoblastes peuvent survivre à plusieurs heures d'ischémie sévère, alors que 20 minutes suffisent à détériorer de façon irrémédiable un cardiomyocyte. De plus, la densité capillaire du muscle squelettique est semblable à celle des zones bordantes de l'infarctus du myocarde, les myoblastes ont donc des chances non négligeables de survivre dans les zones dormantes bordant une zone nécrosée du myocarde.

C. Les études précliniques

Depuis une quinzaine d'années, plus de 70 études précliniques de thérapie cellulaire cardiaque utilisant les myoblastes comme produit de thérapie cellulaire ont été publiées (Dowell *et al.*, 2003).

(a) Faisabilité de la transplantation intramyocardique de myoblastes

La faisabilité de la transplantation de myoblastes autologues adultes a été démontrée pour la 1^{ère} fois par l'équipe du Dr. Chiu, dès 1992, sur un modèle de chien avec une cryolésion du myocarde (Marelli *et al.*, 1992). Lors de différentes études cette équipe a mis en évidence, 8 semaines après transplantation, la présence des cellules transplantées (préalablement transfectées avec un gène codant la β -galactosidase) au niveau de la zone infarctée (Zibaitis *et al.*, 1994; Chiu *et al.*, 1995). D'autres équipes ont confirmé la présence de myotubes au sein du tissu myocardique 7 mois après la transplantation dans un cœur ischémié de porc et plus d'un an après la transplantation dans les cœurs de rat (Al Attar *et al.*, 2003) ou de mouton (Ghostine *et al.*, 2002).

(b) Amélioration de la fonction cardiaque

Toutes les études précliniques s'accordent à montrer que l'injection de myoblastes, dans un modèle animal avec une déficience de la fonction contractile cardiaque, limite l'évolution de l'insuffisance cardiaque, voire restaure la fonction contractile. Ces effets bénéfiques ont été décrits quelque soit le modèle animal (souris, lapin ou mouton) ou la méthode de détection utilisée (échocardiographie, mesure de force contractile *ex vivo*...). Dans la plupart des études utilisant l'injection de myoblastes dans des modèles animaux d'insuffisance cardiaque, une amélioration de la fonction diastolique précède le plus souvent une amélioration de la fonction systolique (Atkins *et al.*, 1999). De façon intéressante, l'amélioration de la fonction cardiaque après la transplantation de myoblastes est d'autant plus importante que la fraction d'éjection ventriculaire gauche est basse. Il existe

également une corrélation linéaire entre le nombre de cellules injectées et l'amélioration de la fonction ventriculaire gauche (Menasche, 2003; Van Den Bos and Taylor, 2003). Des études comparatives ont montré que cette amélioration de fonction contractile du myocarde, secondaire à l'injection de myoblastes, était égale ou supérieure à celle obtenue lorsque l'on injecte d'autres types cellulaires : cardiomyocytes néonataux (Scorsin *et al.*, 2000), fibroblastes (Hutcheson *et al.*, 2000) ou cellules dérivées de la moelle (cellules mésenchymateuses (Guarita-Souza *et al.*, 2006), cellules mononucléées de la moelle (Thompson *et al.*, 2003; Ott *et al.*, 2004b), CD133+ (Agbulut *et al.*, 2004)). La transplantation de myoblastes est d'autant plus intéressante qu'elle potentialise les effets bénéfiques d'un traitement aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Pouzet *et al.*, 2001b), un traitement pharmacologique classiquement utilisé chez les patients pour prévenir les phénomènes de remodelage.

Chez l'animal, le taux de survie des myoblastes après transplantation intramyocardique est très faible (Azarnoush *et al.*, 2005; Maurel *et al.*, 2005). Il correspond à celui observé dans les protocoles de thérapie cellulaire du muscle squelettique (Beauchamp *et al.*, 1999) : on observe plus de 90% de mortalité dans les heures suivant la transplantation (Azarnoush *et al.*, 2005). Néanmoins, dans les jours suivant la transplantation intramyocardique, les myoblastes survivants entrent dans une phase de division intense (ils ont en effet la capacité de se multiplier *in situ* pendant quelques jours) puis se différencient en myotubes matures en quelques semaines (Maurel *et al.*, 2005). Cependant, certaines cellules ne se différencient pas et adoptent le statut de cellules satellites. Ainsi, 1 an après une transplantation intramyocardique de myoblastes il est possible d'obtenir de nouvelles cellules musculaires à partir d'une simple biopsie cardiaque (Jain *et al.*, 2001; Al Attar *et al.*, 2003; Ott *et al.*, 2004a).

(c) *Phénotype des cellules transplantées*

Quelques semaines après leur transplantation au sein du tissu myocardique les myoblastes se différencient en cellules striées et multinucléées (Reinecke *et al.*, 1999), dont l'axe s'aligne spontanément sur celui des cardiomyocytes hôtes (Murry *et al.*, 1996b; Chiu, 1999). Ces cellules striées expriment les isoformes rapides des

chaînes lourdes de la myosine spécifiques du muscle squelettique (Koh *et al.*, 1993; Murry *et al.*, 1996b), ainsi que SERCA1, une protéine de transport du calcium, elle aussi spécifique des myotubes (Robinson *et al.*, 1996).

Chez les mammifères adultes, les chaînes lourdes de la myosine squelettique sont composées de 4 isoformes majeures: une isoforme lente, ainsi que 3 isoformes rapides (les IIa, IIb ou IIx/d ; (Schiaffino and Reggiani, 1994). Les myoblastes des cultures primaires sont généralement issus de muscles squelettiques composés essentiellement des isoformes rapides des chaînes lourdes de la myosine squelettique (Lucas *et al.*, 2000). Ces isoformes rapides (IIa et IIb) qui n'expriment pas la β MHC, ont une capacité de fonctionnement en anaérobie limitée et fatiguent rapidement. De ce fait, ces isoformes ne sont habituellement pas exprimées au niveau de tissus musculaires devant subir des contractions intenses et/ou chroniques. A l'inverse, l'isoforme lente des chaînes lourdes de la myosine squelettique a une forte capacité à réaliser des phosphorylations oxydatives, une grande résistance à la fatigue, et des caractéristiques physiologiques plus proches de celles des cardiomyocytes (Murry *et al.*, 1996a). De plus, l'isoforme lente utilise la β MHC comme protéine contractile principale ; protéine qui est majoritairement exprimée par les cardiomyocytes de rat lors du développement cardiaque. L'expression des gènes codant ces différentes isoformes est très modulable et leur niveau d'expression peut varier en fonction de nombreux facteurs comme : l'innervation musculaire (Schiaffino and Reggiani, 1996), les facteurs hormonaux (Caiozzo and Haddad, 1996), ou encore des modifications de l'activité musculaire (Baldwin and Haddad, 2001). Une conversion de l'isoforme rapide en isoforme lente des chaînes lourdes de la myosine squelettique est observée au niveau du muscle squelettique en cas de stimulation excessive ou chronique. Lors de la première expérience de reconstruction cardiaque, une greffe tissulaire d'un muscle squelettique avait été réalisée autour des ventricules, dans un modèle canin. Après une stimulation électrique *in situ* de 2 mois (à un rythme nécessaire au bon fonctionnement du myocarde), il a été observé sur ce tissu musculaire une conversion totale des fibres musculaires de type rapide en fibres musculaires de type lent, plus résistantes à la fatigue et donc plus adaptées à une stimulation chronique (Acker *et al.*, 1987). De la même manière, *in vitro*, une stimulation

électrique chronique des myotubes peut entraîner une expression du phospholamban, protéine normalement exprimée au niveau des cardiomyocytes (Leberer *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1995).

Lors des expérimentations de thérapie cellulaire cardiaque, le suivi à 1 an d'animaux (rats et moutons) transplantés avec des myoblastes autologues a mis en évidence une diminution de l'expression des isoformes rapides des chaînes lourdes de la myosine squelettique et une surexpression de l'isoforme lente (Ghostine *et al.*, 2002; Al Attar *et al.*, 2003). Une autre étude a identifié des myoblastes exprimant à la fois les isoformes rapides et l'isoforme lente des chaînes lourdes de la myosine quelques semaines après une transplantation intramyocardique (Murry *et al.*, 1996b). Robinson *et al.* ont mis en évidence une co-expression du phospholamban et de la protéine de transport SERCA1 au niveau de certains myoblastes transplantés 4 mois après la transplantation intramyocardique (Robinson *et al.*, 1996). Bien que ces études suggèrent que les cellules musculaires squelettiques transplantées se différencient en myotubes et subissent un remodelage afin de s'adapter à leur environnement, il n'y a pas été mis en évidence de transdifférenciation des cellules musculaires squelettiques en cardiomyocytes. En effet, certains marqueurs spécifiques des cardiomyocytes tels que la troponine I ou certains canaux spécifiques du myocarde ne sont pas exprimés au niveau de ces cellules d'origine myogénique (Reinecke *et al.*, 2002).

En résumé, les études précliniques de transplantation intramyocardique de myoblastes ont démontré la faisabilité de la préparation cellulaire, la capacité des myoblastes à s'implanter dans le tissu myocardique et à se différencier en cellules striées, ainsi qu'une amélioration de la fonctionnalité du myocarde après la transplantation. Mais plus important, les myotubes ainsi formés semblent modifier leur phénotype en fonction du milieu environnant, afin semble-il de s'adapter aux contractions chroniques nécessaires au bon fonctionnement du myocarde.

V. LES PREMIERS ESSAIS CLINIQUES

Au vu des résultats prometteurs des essais précliniques, la première étude clinique de phase I a débuté en 2000 à Paris, réalisée conjointement par les équipes du Pr. Ménasché et du Dr. Schwartz. Dix patients, avec une insuffisance cardiaque sévère ou modérée (évaluation basée sur la fraction d'éjection ventriculaire gauche) et secondaire à un infarctus du myocarde, ont subi une série d'injections intramyocardiques de myoblastes autologues. Ces injections intramyocardiques ont été réalisées à l'aide d'une seringue, dans une zone non viable et non revascularisable (certifiée par échographie et PET-Scan) au décours d'une chirurgie à thorax ouvert ayant pour but de réaliser un pontage coronarien. Le produit de thérapie cellulaire avait été préparé à partir d'une biopsie musculaire de 12g, réalisée sous anesthésie locale. Chez ces patients, 0,5 à 1 milliard de cellules ont été injectées ($0,871 \pm 0,062 \cdot 10^9$ cellules en moyenne). Le pourcentage de myoblastes dans ces cultures primaires allait de 57 à 97% (évaluation basée sur le pourcentage de cellules CD56+ ; (Menasche *et al.*, 2003)).

Une amélioration de la fonction contractile du myocarde de ces patients a été observée au suivi à 11 mois. Des examens échocardiographiques répétés ont montré que sur les 22 segments non revascularisés, visualisés comme non contractiles et nécrosés lors de l'échographie préopératoire, 14 avaient une capacité contractile au suivi à 11 mois. Des analyses de PET-Scan ont mis en évidence dans la zone injectée une reprise de l'activité métabolique bien que celle-ci soit située en dehors de la zone pouvant bénéficier du pontage. Bien qu'il soit difficile d'établir les apports respectifs du pontage et de la greffe cellulaire dans cette amélioration, l'amélioration globale de la fraction d'éjection ventriculaire de 8% (33% d'augmentation relative observée, par échographie) est bien supérieure à celle que l'on espérait avec une procédure de revascularisation seule.

Un décès non lié à la procédure de transplantation est survenu pendant la période post opératoire. Un second patient est décédé 17 mois après l'opération, d'un accident cérébrovasculaire, lui aussi non lié à la procédure de transplantation

de myoblastes autologues. L'examen post-mortem du cœur de ce patient a montré la présence de petits foyers de cellules musculaires squelettiques au niveau du ventricule gauche du patient, avec la formation de fibres musculaires alignées au niveau de l'épicarde du patient. Une analyse immunohistochimique de ces tissus a permis de montrer que ces fibres musculaires co-exprimaient les isoformes rapides et les lentes de chaînes de la myosine squelettique. Ces résultats confirment que tout comme chez les modèles animaux, chez l'homme les myoblastes sont capables de s'implanter puis de se différencier au sein du tissu myocardique. Ici également on observe une évolution du phénotype des cellules musculaires transplantées, ce qui suggère un remodelage de ces cellules afin qu'elles puissent supporter une stimulation de longue durée.

Cependant, au cours de cette étude, des épisodes de tachycardie ventriculaire ont été observés chez la moitié des patients. Ces troubles du rythme ont été mis en évidence dans le premier mois suivant la thérapie cellulaire chez 4 patients, et au bout de 45 mois chez un 5^{ème} patient. En plus de la prescription de β -bloquants et d'amiodarone, tous ces patients ont été appareillés avec un défibrillateur automatique implantable (DAI) et, pour 3 d'entre eux, une opération de re-synchronisation a été nécessaire (Hagege *et al.*, 2006). Le degré d'insuffisance cardiaque de ces patients au début de l'étude ne semble pas avoir influencé le déclenchement de ces arythmies. Cependant, le nombre de cellules injectées chez les 5 patients ayant eu des troubles du rythme est significativement plus important que le nombre de cellules injectées chez les patients n'ayant pas eu de troubles du rythme (respectivement $0,956 \pm 0,041 \cdot 10^9$ cellules et $0,695 \pm 0,082 \cdot 10^9$ dans chacun des groupes). Pourtant, devant le faible nombre de patients, il est difficile de conclure quant à l'influence du nombre de cellules sur le risque arythmogène.

L'équipe de Siminiak *et al.* de Poznan (Pologne), a réalisé une étude chez 10 patients souffrant d'insuffisance cardiaque modérée (Siminiak *et al.*, 2004). Dans cette étude, les injections intramyocardiques ont aussi été réalisées pendant une chirurgie nécessaire au pontage coronaire. Dans cette étude, un patient est décédé à l'hôpital des suites d'un infarctus du myocarde (probablement secondaire à la procédure de revascularisation). Chez les 9 autres patients inclus, il a été observé

une amélioration de la contractilité de certains segments au suivi à 12 mois. Cependant, dans cette étude encore, du fait de l'absence de groupe contrôle il n'est pas possible de conclure à une efficacité de la transplantation de myoblastes autologues.

Bien que le nombre de cellules injectées chez ces patients soit moins important que dans l'étude précédente ($< 0,5.10^9$ cellules), les 4 premiers patients inclus ont eu des tachycardies ventriculaires soutenues au décours de la transplantation de myoblastes autologues. Les 6 patients suivants ont été traités avec de l'amiodarone en prophylaxie, et aucune autre tachycardie n'a été rapportée.

Ainsi, lors de ces 2 études, on observe que plus de 40% des patients transplantés avec des myoblastes ont eu des troubles du rythme ventriculaires dans les semaines suivant la transplantation intramyocardique de myoblastes. Ce pourcentage important de patients avec troubles du rythme ventriculaires a conduit les investigateurs à modifier les critères d'inclusions et/ou les protocoles de ces études cliniques. Ainsi dans les études suivantes, la majorité des investigateurs ont mis en place une prophylaxie à l'amiodarone lors de la transplantation. Dans ces études, le pourcentage de patients ayant des troubles du rythme ventriculaires diminue jusqu'à 15 ou 20% (voir tableau IIa). Ce pourcentage correspond à celui généralement observé chez des patients insuffisants cardiaque avec une fraction d'éjection similaire à celle des patients inclus dans ces études de thérapie cellulaire cardiaque (Dib *et al.*, 2005).

Malgré la présence d'arythmies, les résultats de ces études se sont montrés encourageants en terme de faisabilité, et prometteurs en terme d'efficacité. En effet, toutes les autres études de transplantation intramyocardique de myoblastes réalisées sur des patients au décours d'une chirurgie de pontage coronaire suggèrent elles aussi une amélioration de la fonction cardiaque après la greffe. Cependant, dans toutes ces études de phase I, il est difficile d'établir les apports respectifs du pontage et de la greffe cellulaire dans cet effet bénéfique. Il a donc été mis en place, conjointement par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris et en collaboration avec la société Genzyme (technologie Myosix), un essai clinique de

phase II. Le protocole MAGIC (*Myoblasts Autologous Grafting in Ischemic Cardiopathy*) a été le premier essai clinique réalisé en aveugle, randomisé, multicentrique et international. Il a inclus des patients devant subir une procédure de pontage coronaire et y a associé une procédure de transplantation de myoblastes autologues. Cette étude devait inclure 300 patients et était composée de 3 bras : un groupe contrôle ne subissant pas de transplantation de myoblastes, et 2 groupes traités : l'un avec injection de 0,4 milliard de cellules et l'autre avec injection de 0,8 milliard de cellules. Ainsi, dans cet essai, le nombre maximal de cellules injectées est inférieur à la moyenne de cellules injectées lors de l'essai de phase I (0,871 milliard de cellules). Cependant, au vu du risque arythmogène potentiel, tous les patients inclus dans cette étude devaient avoir un traitement prophylactique à l'amiodarone et étaient appareillés avec un défibrillateur automatique implantable (DAI) dès le début de l'étude.

Ce protocole clinique a été suspendu en 2006 après l'inclusion d'une centaine de patients pour une analyse intermédiaire. Cet arrêt n'est cependant pas secondaire à une fréquence anormalement élevée de troubles du rythme ventriculaires : sur les 63 premiers patients inclus, seulement 6 ont eu des troubles du rythme ventriculaires. De plus, il ne semble pas avoir de différence dans le déclenchement des troubles du rythme ventriculaires entre les 3 groupes (Dib *et al.*, 2005).

D'autres études de phase II sont actuellement en cours (tableau IIb). Dans ces études, à l'inverse du protocole MAGIC, les injections de myoblastes s'effectuent par voie endocoronaire ou endocardique et ne sont pas associées à une procédure de pontage coronaire. Là aussi les patients inclus dans ces études ont un traitement prophylactique à l'amiodarone et souvent la pose d'un DAI.

Tableau IIA

Etude	Protocole	Procédure associée	patients	Arythmies
Ménasché et al., Hôpital Bichat, Paris, France (Hagège et al., 2003) (Ménasché et al., 2006)	Phase I, 1 seul centre Patients avec IDM ancien injection directe de $871 \cdot 10^6$ cellules NYHA II-IV	Procédure de revascularisation coronnaire	10 patients inclus	5 Patients avec des TV implanté avec un DAI Amiodarone efficace chez 3 patients
Herreros et al. Université de Navarre, Pampelone, Espagne (Herreros et al., 2003) (Chacques et al., 2004)	Phase I, 1 seul centre Patients avec IDM ancien injection directe de $300 \cdot 10^6$ cellules NYHA I-III	Procédure de revascularisation coronnaire	20 patients	Pas de TV Tous les patients avec amiodarone en prophylaxie
Siminiak et al. Poznan, Pologne (Siminiak et al., 2004)	Phase I, 1 seul centre Patients avec IDM ancien injection directe de $20 \cdot 10^6$ cellules NYHA II-III	Procédure de revascularisation coronnaire	10 patients inclus	2 patients avec TV soutenue juste après la transplantation 2 autres patients avec TV dans les 2 semaines suivantes 6 autres patients avec amiodarone en prophylaxie
Pagani et al. Université du Michigan, Ann Arbor, USA (Pagani et al., 2003)	Phase I, 1 seul centre Patients en attente d'une transplantation cardiaque injection de $300 \cdot 10^6$ cellules	Pose d'une assistance circulatoire	5 patients inclus	Pas d'arythmie
Dib N et al. Arizona Heart Institute, Phoenix, USA (Dib et al., 2005)	Phase I, 1 Multicentrique Patients avec IDM ancien et DAI Différentes doses : $10 \cdot 30 \cdot 100$ et $300 \cdot 10^6$ cellules	Procédure de revascularisation coronnaire	24 patients inclus	1 patient DCD de VF (suite de la procédure de pontage ?) 3 patients avec TVNS
MAGiC trial Hôpital Bichat, Paris, France	Phase II, Multicentrique, Randomisée Patients avec IDM ancien et DAI 3 bras : placebo - 400 et $800 \cdot 10^6$ cellules	Procédure de revascularisation coronnaire	2003-2006 (suspendue)	Tous les patients avec amiodarone et DAI en prophylaxie 6 TV parmi les 63 premiers patients inclus Pas de différence inter-groupes

Tableau IIB

Etude	Protocole	Procédure associée	Patients	Arythmies
Smits et al. Erasmus Medical center, Rotterdam, Les Pays Bas (Smits <i>et al.</i> , 2003)	Phase I, Etude pilote Patients avec IDM NYHA II-IV injection endocardique	Pas de procédure associée	5 patients inclus	1 TVNS à 2 mois
Smits et al., Rotterdam, Les Pays Bas Nienaber et al. Rostock, Allemagne Colombo et al., Milan, Italie	Phase I, Multicentrique, Patient avec IdM (9 avec DAI) NYHA II-IV Injection endocardique	Pas de procédure associée	15 patients inclus	1 mort subite à 9 jours 1 TVS à 10 jours 3 patients avec TVNS avant 3 mois
Siminiak et al., Poznan, Pologne	Phase I, un seul centre Patients avec IDM NYHA II-III injection endocoronaire	Pas de procédure associée	10 patients inclus	Amiodarone
Smits et al., Rotterdam, Les Pays Bas	Phase I, un seul centre Patients avec IDM NYHA II-IV injection endocoronaire	Pas de procédure associée	débutée en 2002 10 patients inclus	Etude encore en cours
Sherman et al., New York, USA	Phase I, multicentrique Patients avec IDM et DAI NYHA II-III injection endocardique	Pas de procédure associée	débutée en 2003 10 patients inclus	Etude encore en cours

VI. TROUBLES DU RYTHME ET TRANSPLANTATION DE MYOBLASTES : HISTOIRE NATURELLE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE OU EFFETS INDESIRABLES ?

Alors qu'aucun trouble du rythme sévère n'avait été mis en évidence lors des études précliniques de transplantation de myoblastes autologues, les investigateurs des premiers essais cliniques ont été confrontés à l'apparition d'arythmies ventriculaires sévères au décours de la procédure de transplantation (Menasche *et al.*, 2003; Pagani *et al.*, 2003; Smits *et al.*, 2003; Siminiak *et al.*, 2004).

Les patients inclus dans ces études proviennent d'une population hétérogène d'individus souffrant d'insuffisance cardiaque. Tous les patients inclus avaient eu un infarctus du myocarde plusieurs années auparavant, et lors de leur inclusion, avaient une insuffisance cardiaque de classe II à IV : leur ventricule gauche était déjà dilaté et avait subi un remodelage et sont de ce fait déjà considérés comme prédisposés à avoir des troubles du rythme ventriculaires. De plus, dans ces premières études cliniques, très peu d'attention était portée sur la stabilité électrique du myocarde des patients avant leur inclusion dans l'étude. Ainsi, même si la majorité des patients inclus était asymptomatiques concernant les troubles du rythme ventriculaires, il est fort possible qu'une proportion non négligeable des patients recrutés pour ces études avait déjà une tendance à avoir des troubles du rythme ventriculaires avant la greffe de myoblastes. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que la plupart des patients inclus dans les protocoles de thérapie cellulaire cardiaque remplissent tous les critères d'inclusion justifiant l'implantation d'un DAI selon l'étude MADIT II (Moss *et al.*, 2002). L'implantation d'un DAI est d'ailleurs maintenant de rigueur pour tout patient insuffisant cardiaque entrant dans un protocole de thérapie cellulaire avec injection de myoblastes.

Ces premières études de transplantation de myoblastes ne comprennent qu'un nombre limité de patients et pas de groupe contrôle. L'hypothèse d'une augmentation des troubles du rythme après une greffe de myoblastes autologues, comme semble l'indiquer les premières études cliniques de Phase I, demande

cependant à être vérifiée. Les troubles du rythme observés sont-ils la conséquence de l'évolution de l'insuffisance cardiaque de ces patients ou sont-ils liés à la présence de cellules musculaires squelettiques au sein du tissu myocardique ? En l'absence de groupe contrôle, il n'est pas possible de conclure quant à leur origine. Même si quelques études de phase II sont en cours, leurs résultats ne sont pas encore disponibles.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'utilisation de sérum de veau fœtal lors des cultures cellulaires de myoblastes autologues avant implantation pouvait augmenter le risque inflammatoire lors de la réinjection des cellules au sein d'un tissu myocardique humain. Afin de vérifier cette hypothèse, ces auteurs ont, lors d'une étude clinique, utilisé du sérum autologue lors du processus de culture cellulaire (Chachques *et al.*, 2004). Dans cette étude, aucun des 20 patients n'a eu de trouble du rythme ventriculaire. Cependant, tous les patients de cette étude ont reçu 500 mg de prednisolone en post procédure ainsi qu'un traitement à l'amiodarone pendant les 3 mois suivants. Le biais induit par la nécessité d'un traitement prophylactique à l'amiodarone (traitement prescrit dans l'étude décrite ci-dessus mais également dans beaucoup d'autres), rend hasardeux l'utilisation de ces données cliniques pour une étude portant sur le risque arythmogène de la thérapie cellulaire cardiaque.

L'injection intramyocardique est la méthode la plus utilisée pour introduire des myoblastes au sein du tissu myocardique. Il est possible que les dommages causés par la procédure elle-même ou l'injection de milieu de culture jouent un rôle dans les arythmies observées après la transplantation cellulaire. Une injection intramyocardique d'un volume de 0,1 à 0,2 mL peut causer un léger œdème voire une petite réaction inflammatoire (Ben-Dor *et al.*, 2006), mais la réponse à ce léger traumatisme est sans conséquence sur le fonctionnement global du myocarde. Cependant, lors d'un protocole de thérapie cellulaire cardiaque, il peut être réalisé plus de 57 injections, ce qui dans ce cas peut causer un réel traumatisme mécanique ou une inflammation substantielle.

On ne peut cependant pas exclure que ces arythmies soient liées à la seule présence de myoblastes au sein du tissu myocardique. En effet, par comparaison aux études cliniques de thérapie cellulaire cardiaque utilisant des cellules dérivées de la moelle (même avec injection intramyocardique), les patients transplantés avec des cellules musculaires squelettiques semblent avoir un plus grand risque de faire des arythmies ventriculaires (Ben-Dor *et al.*, 2006).

VII. LES CONNEXINES

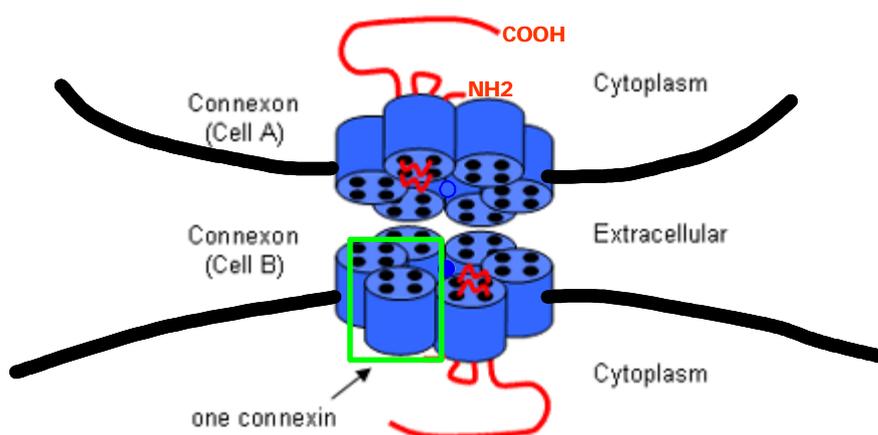
Dans le myocarde les contractions séquentielles qui composent les battements cardiaques dépendent de l'onde de dépolarisation générée par le noeud sino-auriculaire puis de la propagation de cette onde d'un cardiomyocyte à l'autre au travers des ventricules. Le bon fonctionnement du myocarde repose donc entre autres sur l'interaction coordonnée des cardiomyocytes les uns avec les autres, ce qui nécessite un système complexe de communication. Selon les connaissances actuelles, cette organisation dépend surtout des jonctions communicantes qui assurent la conduction des ondes d'excitation et permettent ainsi l'assemblage des cellules cardiaques en un syncytium fonctionnel (Severs *et al.*, 2001).

Ces jonctions communicantes, aussi appelées « gap junctions », sont des canaux intercellulaires mettant en relation le cytoplasme de deux cellules voisines. Elles sont composées d'un canal qui est lui même constitué par l'assemblage de deux demi-canaux appelés connexons, fournis chacun par l'une des deux cellules en contact. Chaque connexon résulte de l'association de six protéines intermembranaires, les connexines (Cx), qui s'assemblent en délimitant un pore hydrophile (figure 1).

Les Cx constituent une famille multigénique dont les membres présentent une forte homologie. Chaque Cx est composée de 4 domaines transmembranaires et de 2 boucles intracellulaires. La boucle intracellulaire qui relie les domaines transmembranaires 2 et 3 ainsi que la terminaison carboxyle de l'acide aminé sont composées de séquence d'acides aminés uniques qui confère des propriétés particulières à la jonction communicante qu'elle compose et un poids moléculaire

spécifique. Ainsi chaque connexine est nommée par l'abréviation Cx suivie de son poids moléculaire.

Figure 1 : Représentation schématique d'une jonction communicante



Chaque jonction communicante est composée de 2 connexons appartenant à 2 cellules adjacentes. Chaque connexon est lui même composé de 6 connexines (protéines transmembranaires). La boucle intracellulaire et la terminaison carboxyle (COOH) permettent de caractériser les différentes connexines.

Au niveau du myocarde humain, trois connexines sont exprimées : la Cx43, la Cx40 et la Cx45. Ces Cx ont chacune des profils d'expression spatiotemporelle et des propriétés électrophysiologiques qui leur sont propres. Ainsi les cardiomyocytes participant au système de conduction expriment les Cx40 et Cx45, alors qu'au niveau auriculaire, ce sont les Cx43 et Cx40 qui sont exprimées. Au niveau ventriculaire, la Cx43 est majoritaire avec cependant une faible expression de la Cx45.

Des études menées chez les rongeurs révèlent les liens existant entre l'altération de l'expression de ces connexines et le développement d'arythmies. Le knock-out de la Cx43 étant létal (Ya *et al.*, 1998), des souris n'exprimant plus de Cx43 spécifiquement dans le cœur ont été générées (Gutstein *et al.*, 2001). Ces souris présentent une vitesse de conduction ventriculaire réduite et développent des

arythmies ventriculaires spontanées, rapidement létales. D'autres études, ayant pour stratégie le remplacement du gène de la Cx43 par celui de la Cx32 ou de la Cx40 (Theis *et al.*, 2000), ont confirmé l'importance de cette connexine. En effet, les souris transgéniques exprimant la Cx32 ou la Cx40 développent des arythmies spontanées, semblables à celles observées lorsque la Cx43 est invalidée dans le cœur adulte (van Rijen *et al.*, 2004). Ces études indiquent que les jonctions communicantes formées par la Cx43 sont essentielles au bon fonctionnement du ventricule mature.

BUTS DE LA THESE

De nombreuses études précliniques ont montré l'efficacité de la greffe de myoblastes comme traitement de l'insuffisance cardiaque. Les quelques études cliniques de phase I, incluant des sujets avec une insuffisance cardiaque chronique d'origine ischémique, suggèrent la faisabilité et l'efficacité de la transplantation intramyocardique de myoblastes autologues. Cependant, lors de ces premières études cliniques est apparu un effet indésirable grave, qui n'avait pourtant jamais été observé lors des nombreuses études précliniques : la survenue de tachycardies ventriculaires dans les semaines suivant la transplantation intramyocardique de myoblastes autologues.

La majorité des patients inclus dans ces protocoles de thérapie cellulaire cardiaque avaient une insuffisance cardiaque sévère, avant même la transplantation de myoblastes. Ces patients avaient donc déjà un risque accru d'être sujet à des arythmies ventriculaires, voire même un risque de mort subite. Dans ces études de faisabilité, l'absence de groupe contrôle rend impossible la mise en relation de façon certaine des arythmies avec la thérapie cellulaire. De plus, le traumatisme créé par les injections intramyocardiques réalisées lors de la transplantation de myoblastes peut générer une inflammation et entraîner des arythmies ventriculaires chez ces patients. Cependant, on ne peut exclure que ce soit les myoblastes eux-mêmes qui génèrent ces troubles du rythme. En effet, les patients inclus dans les protocoles de thérapie cellulaire avec injection de cellules dérivées de la moelle ne semblent pas être sujets à des troubles du rythme ventriculaires.

Dans ce contexte, notre but a été d'évaluer la stabilité électrique du myocarde après une transplantation intramyocardique de myoblastes autologues. Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes potentiellement impliqués dans de telles arythmies.

Ainsi cette thèse comporte 3 parties :

- La mise au point d'un modèle animal permettant l'étude de la stabilité électrique du myocarde après injection intramyocardique de myoblastes autologues,
- La détermination des conséquences de l'injection intramyocardique de myoblastes autologues sur la stabilité électrique du myocarde et,
- L'étude des mécanismes potentiellement impliqués dans les arythmies secondaires à l'injection intramyocardique de myoblastes autologues.

METHODOLOGIE

I. CHOIX DU MODELE

Afin d'étudier la stabilité électrique du myocarde après greffe de myoblastes, nous voulions établir un protocole expérimental le plus proche possible de celui réalisé en clinique. Il nous paraissait donc important pour notre protocole :

- d'utiliser un modèle de **cardiomyopathie ischémique**,
- d'utiliser des **cultures primaires de myoblastes** comme produit de thérapie cellulaire,
- de réaliser les transplantations de manière **autologue**,
- d'injecter le produit de thérapie cellulaire en **intramyocardique**, et enfin
- d'utiliser des méthodes ***in vivo*** pour évaluer la stabilité électrique du myocarde.

Pour la faisabilité de cette étude, un modèle de rongeur nous a paru le plus approprié, et ce d'autant plus qu'un modèle d'exploration électrophysiologique cardiaque chez la souris avait déjà été mis au point au laboratoire. Concernant le protocole de thérapie cellulaire, différents modèles de souris avec ligature coronaire et injections intramyocardiques ont été décrits dans la littérature. La procédure de ligature coronaire est faisable chez la souris ; cependant, une controverse existe quant à la faisabilité des injections intramyocardiques dans ce modèle de souris avec ligature coronaire (Murry *et al.*, 2004; Kajstura *et al.*, 2005). En effet, compte tenu de la petite taille de l'animal, de l'amincissement de la paroi libre du ventricule gauche après la ligature de l'artère coronaire et de la rapidité des battements cardiaques (500 à 600 battements par minute chez la souris), une procédure d'injection intramyocardique dans la paroi du myocarde est très difficile à réaliser. Il a été décrit un taux d'échec de 44%, et ce même lorsque les injections sont

réalisées par une personne expérimentée (Kajstura *et al.*, 2005). La paroi libre du ventricule gauche du rat a une épaisseur suffisante pour la réalisation d'injections intramyocardiques de façon certaine, et ce même une semaine après l'induction d'un infarctus du myocarde par ligature coronaire (figure 2). De plus, ce modèle de rat avec ligature coronaire a été largement utilisé pour des études de thérapie cellulaire par injection de myoblastes. De ce fait les méthodes de culture primaire de myoblastes sont connues (Pouzet *et al.*, 2001b; Al Attar *et al.*, 2003).

Figure 2 : Coupes transversales de myocarde (rat et souris)

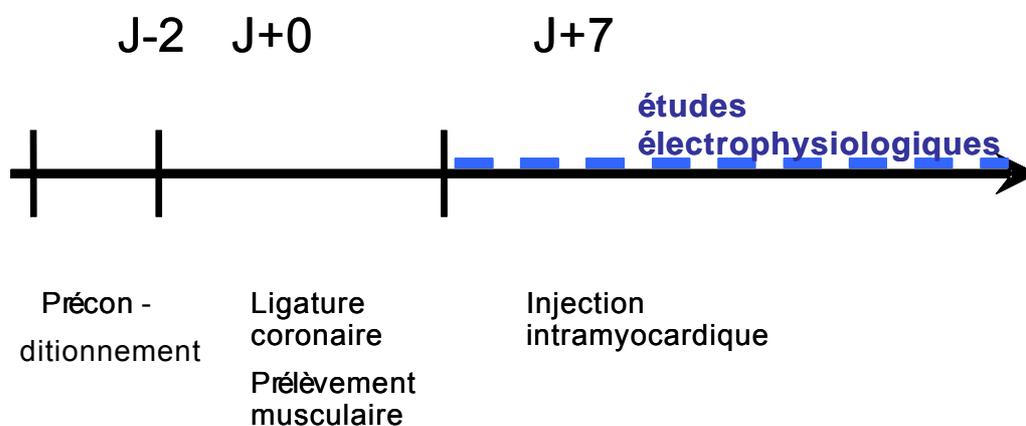


Même une semaine après une ligature de l'artère coronaire, l'épaisseur de la paroi libre du ventricule gauche du rat est suffisante, pour permettre la réalisation d'injections intramyocardiques (aiguille de 30 Gauges représentée). Le même geste opératoire pratiqué sur un modèle murin semble plus délicat.

En résumé, dans un modèle de rat, la ligature coronaire est réalisable sans difficulté, les protocoles de culture primaire sont déjà établis, et surtout ce modèle permet d'avoir une procédure fiable pour l'injection intramyocardique des cellules sur un myocarde nécrosé. Pour toutes ces raisons, ce modèle nous a paru le plus approprié.

Afin de comparer nos résultats avec ceux décrits dans les articles précédemment publiés, nous avons adopté le même protocole que dans ces publications (figure 3). Avec ce protocole, le délai de 7 jours entre la ligature coronaire et l'injection cellulaire est suffisant pour permettre la résorption du processus inflammatoire dû à l'infarctus du myocarde induit par la ligature coronaire (Pfeffer and Braunwald, 1990; Pfeffer *et al.*, 1991; Frimm Cde *et al.*, 1996).

Figure 3 : Protocole de culture et de transplantation des myoblastes.



À J-2, un préconditionnement (PC) des muscles prélevés (les tibialis antérieurs) par injection de bubivacaïne permet l'activation des cellules satellites du muscle squelettique en myoblastes (Pouzet *et al.*, 2001b). Les rats subissent une ligature coronaire à J+0, le jour même de la biopsie. Les myoblastes obtenus à partir de ces biopsies sont réinjectés en intramyocardique à après 7 jours de culture, de façon autologue.

II. MISE AU POINT DES MODELES BIOLOGIQUES

A. Modèle chirurgical

Afin de mettre au point la procédure d'injection intramyocardique, et afin de tester diverses méthodes d'anesthésie, les premiers essais ont été réalisés sur des rats sains (sans ligature coronaire). Le choix de l'anesthésie utilisée est d'autant plus important que les animaux doivent subir 2 interventions à thorax ouvert : une

première pour la ligature coronaire, puis une seconde pour l'injection intramyocardique du produit de thérapie cellulaire. Cette deuxième intervention est très délicate, les animaux ayant déjà une fonction cardiovasculaire diminuée.

Lors de ces premiers essais, les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital sodique (60mg/kg ; ip). En dehors des effets hypotenseur et inotrope négatif l'effet dépresseur respiratoire s'est avéré très handicapant : il était nécessaire de conserver les animaux sous assistance respiratoire pendant plus d'une heure après une chirurgie de 15 minutes.

Nous avons alors testé d'autres types d'anesthésies : tout d'abord une association de pentobarbital sodique (40mg/kg ; ip) et de kétamine (60mg/kg ; ip) puis une association de kétamine (70 mg/kg ; ip) et de xylazine (10 mg/kg ; ip). Dans le premier cas la sédation obtenue était satisfaisante avec peu de dépression respiratoire, mais le temps de réveil était toujours assez long. Avec l'association xylazine/kétamine il s'est avéré difficile d'obtenir une sédation assez profonde pour pouvoir réaliser une chirurgie à thorax ouvert.

Nous avons opté pour l'anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Ce type d'anesthésie nous a permis d'une part d'écourter la phase de réveil et d'autre part d'être plus à l'aise pendant la chirurgie. En effet, il est très facile de moduler ce type d'anesthésie : on peut induire facilement une dépression respiratoire chez les animaux (afin de faciliter la phase d'intubation), conserver une anesthésie profonde pendant les quelques minutes de la chirurgie à thorax ouvert, puis réveiller progressivement les animaux pendant la phase de suture.

Après la chirurgie, les animaux restent sous assistance respiratoire jusqu'aux premiers signes de réveil. Une fois extubés, les animaux demeurent dans une cage sans sciure et sous lampe chauffante jusqu'à ce qu'ils retrouvent leur motricité habituelle.

En vue d'une analgésie, de la nalbupine (0,2 mg/kg ; sc) est injectée à chaque animal à la fin de chaque chirurgie à thorax ouvert.

Lors de la mise au point du modèle, l'efficacité de la ligature coronaire a été vérifiée à l'aide d'un groupe pilote de 12 rats. L'induction d'un infarctus du myocarde par cette ligature coronaire a été vérifiée par ECG juste après la ligature coronaire (décalage du segment ST) et ainsi que dans la semaine suivant la chirurgie (apparition d'une onde Q de nécrose).

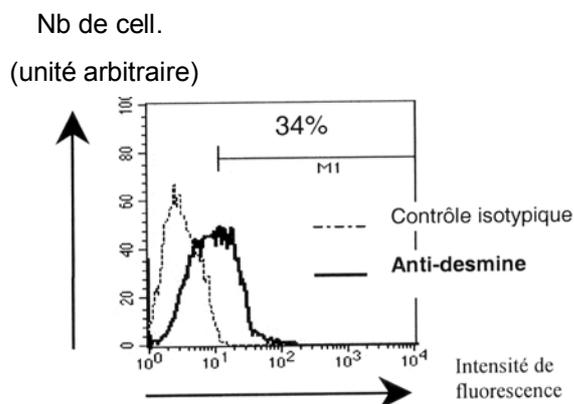
Ces rats ont été sacrifiés 7 semaines après la ligature coronaire. Des analyses d'histomorphométrie réalisées sur ces cœurs ont mis en évidence un infarctus transmural, avec une zone nécrosée de taille similaire d'un myocarde à l'autre ($25\pm 3\%$ du ventricule gauche).

B. Culture cellulaire

1. Culture primaire de myoblastes

La culture primaire de myoblastes en vue d'une injection intramyocardique autologue a été réalisée selon la technique utilisée précédemment par l'équipe du Dr. Jean-Thomas Vilquin. Cette technique a été apprise tout au début de ce travail et n'a pas été modifiée par la suite.

Lors de la mise au point de notre modèle, nous avons voulu vérifier la présence de myoblastes dans nos cultures primaires, et ce juste avant la transplantation. Nous avons réalisé sur ces cultures un immunomarquage dirigé contre la desmine (marqueur spécifique des myoblastes (Pouzet *et al.*, 2001b) (Pouzet *et al.*, 2001a) et quantifié la proportion de myoblastes dans nos cultures par cytométrie en flux. Au bout de 7 jours de culture, le pourcentage de myoblastes est compris entre 25 et 35%. Ce pourcentage est similaire à celui décrit dans les différentes études utilisant les tibialis antérieurs de rat pour réaliser les cultures primaires (Al Attar *et al.*, 2003; Leobon *et al.*, 2003).

Figure 4 : Pourcentage de myoblastes au niveau des cultures primaires

Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules exprimant la desmine (un marqueur spécifique des myoblastes). Sept jours après la mise en culture (c'est à dire le jour de la transplantation), les cultures primaires contiennent 25 à 35% de myoblastes.

2. Cellules mononucléées de la moelle

Afin d'évaluer de façon précise le risque arythmogène après une transplantation intramyocardique de myoblastes, nous avons voulu réaliser des études électrophysiologiques sur des animaux injectés avec un autre type cellulaire. Nous avons choisi les cellules mononucléées de la moelle, qui ont été utilisées dans plusieurs protocoles cliniques de thérapie cellulaire cardiaque, et au cours desquels aucun trouble du rythme n'a pour l'instant été observé.

En vue de réaliser une transplantation autologue, un prélèvement de moelle a été réalisé 7 jours après la ligature coronaire au niveau des os (tibia et fémur) de la patte droite de chaque animal (sous anesthésie générale ; isoflurane 2%). Les cellules mononucléées ont immédiatement été isolées sur gradient de densité (Ficoll). Les injections de cellules mononucléées de la moelle ont été réalisées dans les mêmes conditions que les injections de myoblastes autologues (nombre d'injection, nombre de cellules, volume injecté et localisation des points d'injection).

C. Injections intramyocardiques

1. Chez le rat sain

Les premières injections intramyocardiques ont été réalisées sur des animaux sains, sans ligature coronaire. Les toutes premières injections ont été réalisées avec de l'encre de chine afin de visualiser la localisation de l'injection. Nous avons ensuite utilisé le modèle, sans ligature coronaire, pour une étude en collaboration avec le Dr Bruno Pitard (Pitard *et al.*, 2004). Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité des vecteurs synthétiques pour le transfert de gène au niveau du tissu myocardique.

Lors de ces expériences, différents vecteurs synthétiques complexés avec un plasmide codant la β -galactosidase ont été injectés au niveau de la paroi libre du ventricule gauche des animaux. Trois jours après cette injection, les animaux ont été sacrifiés et les cœurs prélevés. Après action de l'agent révélateur, la β -galactosidase a été détectée au niveau de tous les cœurs injectés (figure 5). Ce résultat confirme que ces injections sont bien réalisées dans la paroi du myocarde et plus précisément au niveau de la paroi libre du ventricule gauche qui est la zone d'intérêt pour la thérapie cellulaire à visée réparatrice du myocarde.

Figure 5 : Myocardes injectés avec vecteurs synthétiques complexés avec un plasmide codant pour la β -galactosidase



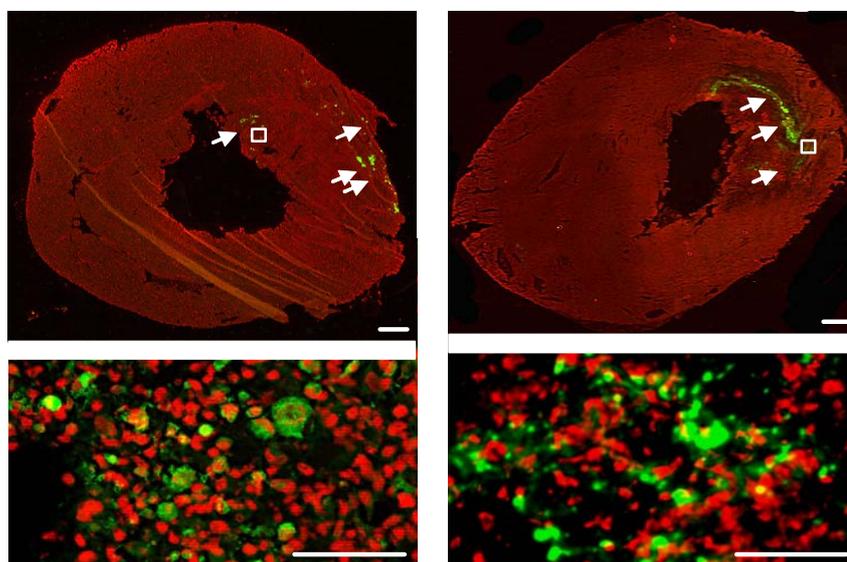
Les sites d'injections sont localisés au niveau de la paroi libre du ventricule gauche, zone d'intérêt pour la thérapie cellulaire.

2. Après ligature coronaire

Pour notre étude de thérapie cellulaire, lors des premières injections intramyocardiques de cellules dans les cœurs de rats avec ligature coronaire, nous

avons choisi de marquer les cellules avec un fluorochrome cytoplasmique : le carboxy fluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFDA-SE). A l'état basal le CFDA-SE est non fluorescent et, du fait de son faible poids moléculaire, diffuse facilement à travers la membrane cytoplasmique des cellules. Au niveau du cytoplasme, le CFDA-SE est hydrolysé par les estérases intra-cellulaires. Il peut alors se fixer de façon covalente sur les protéines cytoplasmiques et devient intensément fluorescent. Du fait de cette liaison covalente, le fluorochrome reste dans le milieu intra cellulaire. Dans un premier temps, nous avons pu à l'aide d'injection myocardique de cellules marquées au CFDA-SE vérifier (1) la réalité de nos injections intramyocardiques 7 jours après ligature coronaire et (2) la survie des cellules (myoblastes ou cellules mononucléées de la moelle). Vingt-quatre heures après l'injection de cellules, les myoblastes ou les cellules mononucléées de la moelle sont visualisés au niveau de la paroi libre du ventricule gauche, tout comme lors des expériences de transfert de gène (figure 6).

Figure 6 : Localisation et survie des cellules injectées



Visualisation des myoblastes (droite) ou des cellules mononucléées de la moelle (gauche) 24h dans des coupes myocardiques de rats infarcis après la greffe de cellules (fluorescence verte). Un marqueur d'ADN (iodure de propidium) permet la visualisation de tous les noyaux cellulaires du tissu cardiaque en rouge. Ces photos ont été obtenues avec un Typhoon Imager. Les surfaces sélectionnées par les rectangles sont montrées à plus gros grossissement. Les barres d'échelle correspondent à 1 mm (haut) ou 100 μ m (bas).

Avec l'aide de ce fluorochrome nous avons envisagé de détecter les cellules injectées (myoblastes ou cellules mononuclées de la moelle) plusieurs semaines après la transplantation. Cependant, il s'est avéré que cette fluorescence n'était plus détectable 1 semaine après la transplantation.

Différents protocoles de marquage cellulaire avant implantation ont été envisagés. Cependant, aucun autre protocole de marquage devant nous permettre le suivi à long terme des cellules transplantées ne nous a paru satisfaisant tant sur le point de la fiabilité du marquage que sur celui de l'innocuité. Les marqueurs membranaires (de la famille du Dil) sont stables dans le temps mais diffusent facilement aux cellules avoisinantes, pouvant conduire à de faux positifs. La transfection des cellules *ex vivo* avec des gènes rapporteurs comme la β -galactosidase ou la GFP ont très souvent été utilisées. Cependant l'expression de ces protéines peut induire une réaction immunitaire conduisant à la destruction des cellules transplantées (Pitard *et al.*, 2002). Il a été également mis en évidence que la transfection de cellules musculaires par le gène codant la GFP pouvait influencer sur la force contractile des cellules (Agbulut *et al.*, 2006).

Aucun autre protocole de marquage *ex vivo* avant transplantation n'a été utilisé. Les myoblastes injectés ont été détectés par immunomarquage dirigé contre la chaîne lourde de la myosine squelettique (Fernandes *et al.*, 2006) plusieurs semaines après la transplantation.

III. ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Une fois le modèle de ligature coronaire et de transplantation cellulaire mis au point, nous nous sommes intéressés aux différentes méthodes permettant l'exploration électrophysiologique des animaux. Afin de nous rapprocher au plus près des conditions observées en clinique humaine, nous avons tout d'abord privilégié les études *in vivo*. Dans un second temps, les études *in vitro* ont été utilisées pour permettre une caractérisation des mécanismes impliqués dans les arythmies.

Pour toutes ces études, les différentes mesures et l'analyse des résultats obtenus ont été réalisées par des opérateurs en aveugle de tout traitement.

A. *In vivo*

1. Stimulation ventriculaire programmée

(a) Mise au point

Lors de cette étude nous avons tout d'abord réalisé des protocoles de stimulation ventriculaire programmée (SVP). Ces protocoles de SVP sont utilisés en routine en clinique ; ce protocole consiste à envoyer des stimuli électriques au myocarde du patient. Le déclenchement ou non de troubles du rythme ventriculaire lors de ces stimulations (visualisé par un ECG de surface) permet de détecter les patients à risque de faire des arythmies ventriculaires.

Au sein du laboratoire, ces protocoles de SVP sont régulièrement utilisés lors d'études électrophysiologiques cardiaques dans des modèles de souris transgéniques (Royer *et al.*, 2005). Pour ces études chez les souris, une électrode est introduite dans le ventricule droit via la jugulaire droite interne de l'animal. Ainsi placée, cette électrode octopolaire permet de réaliser simultanément une stimulation électrique et un enregistrement endocavitaire.

Dans un premier temps nous avons essayé cette méthode de stimulation ventriculaire dans le but de stimuler les rats transplantés avec des myoblastes. Il s'est avéré que l'électrode de 2F (électrode réalisée à la demande pour les SVP de souris) était trop souple pour pouvoir forcer des valves tricuspides du rat et donc pénétrer dans la cavité ventriculaire.

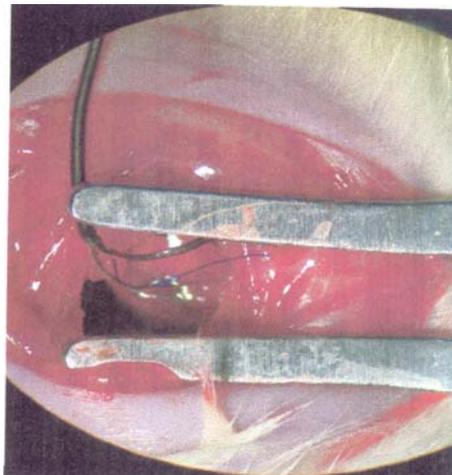
Dans un second temps, nous avons testé une électrode de 7F utilisée habituellement en clinique chez les nourrissons. Le passage des valves tricuspides ne posa pas de problème avec cette électrode plus robuste. Cependant, une fois placée à l'intérieur du ventricule droit, cette électrode plus rigide, mais surtout plus large, ne permettait pas un remplissage correct du ventricule, et au bout de quelques minutes les premiers signes d'ischémie cardiaque apparaissaient sur

l'ECG de surface (décalage du segment ST). Ces signes disparaissaient immédiatement lors du retrait de l'électrode.

Nous avons donc essayé une méthode alternative : la pose à demeure d'une électrode épiscopardique lors d'une chirurgie à thorax ouvert. Les expériences préliminaires menées sur 6 rats, sans infarctus du myocarde, ont montré que la pose d'une telle électrode permettait, sur un même rat, le renouvellement des protocoles de SVP, de façon hebdomadaire, et pendant 5 à 6 semaines. Malheureusement, du fait du processus d'oxydation de ces électrodes, il n'est pas possible de stimuler les animaux au delà de ce délai de 5 à 6 semaines après la pose. Aucun de ces animaux n'a eu de troubles du rythme durant l'un des protocoles de SVP. De plus, les paramètres ECG de ces animaux n'ont pas été modifiés au cours du temps et donc par les stimulations cardiaques répétées. Un examen macroscopique des cœurs prélevés post-mortem n'a pas mis en évidence de lésion dans la zone située autour de l'électrode épiscopardique. Cette méthode étant réalisable et non traumatique sur des animaux sans infarctus du myocarde, nous avons donc choisi cette procédure de stimulation pour notre modèle de rat. Lors de la procédure de SVP pratiquée chez les souris, les animaux sont anesthésiés de façon très légère avec de l'étomidate (8 mg/kg ; ip). La réalisation de cette procédure chez le rat étant légèrement plus traumatique, nous avons choisi une association de pentobarbital (40 mg/kg ; ip), et d'étomidate (8 mg/kg ; ip).

(b) Protocole de Stimulations Ventriculaires Programmées

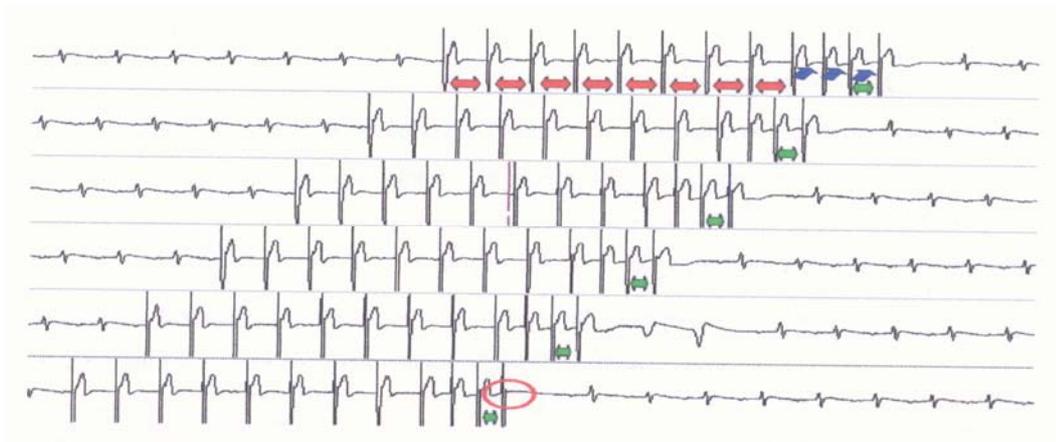
Afin de réaliser ces protocoles de SVP, une électrode épiscopardique est positionnée sur la partie viable du ventricule gauche de l'animal, au moment de la chirurgie à thorax ouvert nécessaire à la ligature coronaire (figure 7). Cette électrode est ensuite tunnelisée sous la peau de l'animal afin d'en permettre, plus tard, un accès aisé.

Figure 7 : Pose d'une électrode épiscopardique : vue opératoire

A J+0 l'animal est anesthésié puis placé sous assistance respiratoire. Les muscles intercostaux sont écartés et une thoracotomie latérale gauche est pratiquée. A l'aide d'une loupe binoculaire, l'artère coronaire gauche principale est visualisée puis ligaturée environ 3 mm sous l'auricule (fil bleu). L'extrémité dénudée de l'électrode épiscopardique est ensuite positionnée sur la partie viable du ventricule gauche. Le thorax est refermé, l'extrémité distale de l'électrode restant en sous-cutané, permettant un accès futur par simple incision de la peau.

Les protocoles de SVP sont réalisés à J14, J21, J28 et J35. Les animaux sont anesthésiés, et l'extrémité distale de cette électrode est externalisée et utilisée comme anode. Une seconde électrode positionnée sur le thorax de l'animal sert de cathode. Durant toute la durée du protocole de SVP, un ECG standard (6 dérivations) est enregistré en haute définition avec filtrage des canaux et conversion numérique. Tout comme lors des protocoles cliniques, nos protocoles de SVP incluent un, 2 et un 3 extra-stimuli réalisés pendant un rythme spontané ou en rythme imposé (c'est à dire après une série de 9 stimulations électriques espacées chacune de 100ms ; figure 8).

Figure 8 :Exemple d'ECG enregistré lors d'une Stimulation Ventriculaire Programmée



Stimulation ventriculaire programmée en rythme imposé (train de 9 stimuli 100 ms d'intervalle ; flèches bleues) suivi de 3 extra stimuli (flèches rouges). L'intervalle de couplage entre les 2 derniers extra-stimuli (flèches vertes) est diminué de 2 ms en 2 ms jusqu'à l'obtention de la période réfractaire effective ventriculaire PRE ; cercle rouge).

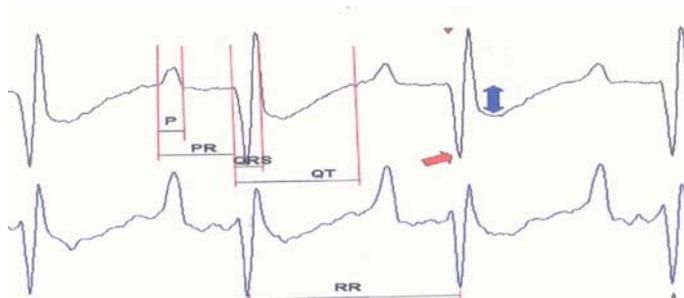
Selon les critères standards, les extrasystoles ventriculaires doivent contenir au moins 2 des 3 critères suivants : 1) QRS de configuration atypique avec altération ou inversion de l'onde T, 2) pose extrasystolique, 3) dissociation atrioventriculaire. D'après la convention de Lambeth (Walker *et al.*, 1988), définissant les critères de classification des troubles du rythme chez les petits animaux une tachycardie ventriculaire est considérée comme soutenue lorsqu'elle dépasse 15 extrasystoles, une tachycardie non soutenue est composée de 6 à 14 complexes, et en dessous de 5 complexes atypiques, il s'agit d'extrasystoles isolées.

En cas de déclenchement d'une TV soutenue le protocole de SVP est interrompu.

Les procédures de SVP ainsi que l'analyse des ECG enregistrés lors des procédures de SVP sont réalisées, en aveugle, avec le logiciel ECG auto 1.5.7. Les ondes P, et QRS, correspondant respectivement aux dépolarisations auriculaires et

ventriculaires, ainsi que les intervalles PR (reflet du temps de conduction auriculo-ventriculaire), et RR (période cardiaque) sont mesurés sur 4 complexes successifs et moyennés (figure 9).

Figure 9 : Mesure des ondes P, QRS et des intervalles PR, QT, RR.



On observe sur ce tracé ECG, réalisé une semaine après une ligature coronaire, une onde Q ample et profonde (flèche rouge) ainsi qu'une inversion de l'onde T (flèche bleue), signes d'une nécrose myocardique constituée.

2. Télémétrie

Afin de réaliser des mesures électrophysiologiques dans des conditions plus proches de la clinique ambulatoire nous avons également effectué des enregistrements d'ECG par télémétrie : c'est à dire un enregistrement réalisé en continu sur animal non anesthésié, indépendamment des périodes de veille ou de sommeil de l'animal.

Afin de permettre ces enregistrements, un radio-émetteur a été placé dans l'abdomen de l'animal, au décours de la chirurgie nécessaire à la ligature coronaire. L'anode de ce radio-émetteur est placée au niveau de l'épaule droite du rat alors que la cathode est tunnelisée jusqu'à la patte arrière gauche de l'animal. L'enregistrement de l'ECG débute juste après l'injection des cellules et continue par période de 24h toutes les 72h pendant 5 semaines.

B. Ex vivo : mesure des potentiels d'action monophasiques en intra-mural

Les méthodes d'études électrophysiologiques décrites précédemment permettent de détecter la présence ou non d'arythmie, mais ne nous permettent pas d'avoir des indications quant aux mécanismes impliqués dans ces arythmies. En collaboration avec H. van Rijen et J. De Bakker (Dept. of Medical Physiology, University Medical Center Utrecht, Netherlands), nous avons réalisé des mesures de potentiel d'action monophasique en intra-mural. Ces mesures ont été réalisées *ex vivo* 2 semaines après la transplantation de myoblastes autologues (soit 3 semaines après la ligature coronaire), sur des cœurs de rats perfusés.

Pour ces études, les animaux ont été sacrifiés par injection de pentobarbital sodique (100 mg/kg ; ip). Afin d'éviter tout risque de coagulation lors du sacrifice, de l'héparine a été injectée au moment du sacrifice (3750 UI/kg ; ip). Les myocards des animaux ont été prélevés puis perfusés de façon rétrograde avec une solution physiologique (NaCl 118,3 mM ; KCl 3,8 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; glucose 11,1 mM ; CaCl₂ 1,25 mM), saturée en carbogène (CO₂ 95% et O₂ 5%) et maintenue à 37°C.

Les potentiels d'action monophasiques enregistrés en intra-mural ont été mesurés à l'aide d'une électrode de tungstène à différents sites du myocarde (1 point au niveau du ventricule droit et 6 points au niveau du ventricule gauche, dont 3 dans la zone infarctée et 3 dans des zones non infarctées).

Figure 10 : Enregistrement des potentiels d'action monophasiques.



Des électrodes de tungstène sont placées à différents niveaux des ventricules. Ces électrodes permettent l'enregistrement des potentiels d'action monophasiques en intra-mural. Ici 3 électrodes sont placées au niveau du ventricule gauche : une dans la zone saine, une en bordure de la zone infarctée et une 3^{ème} au centre de la zone infarctée.

IV. TRANSDUCTION PAR LE LENTIVIRUS

Une surexpression stable de la Cx43 dans les cultures primaires de myoblastes, a été induite *ex vivo* par transduction des cultures primaires à l'aide d'un lentivirus codant la Cx43 de rat (pHR'-CMV-Cx-W-sin18, obtenu auprès du Pr. Paolo Meda ; (Caton *et al.*, 2003)).

La construction puis la production de ce lentivirus ont été réalisées par le LentiVirus Production Unit (LVPU) à Genève. Les plasmides codant les protéines d'enveloppe et de capsulation sont respectivement le pMD2G et le psPAX2 (plasmides fournis par le LVPU ; <http://tronolab.epfl.ch>).

Afin de vérifier l'innocuité de la transduction sur les cultures primaires de myoblastes, nous avons choisi d'utiliser comme contrôle des cellules transduites avec un lentivirus non codant : un lentivirus de même construction, mais où la séquence pHR'-CMV-Cx-W-sin18 a été remplacée par le plasmide pcDNA3.1.

La transduction des cultures primaires a été réalisée *ex vivo* en ajoutant le lentivirus dans le milieu de culture le lendemain de l'isolement cellulaire.

V. PCR EN TEMPS REEL : LA TECHNOLOGIE TAQMAN

Lors des expériences de transduction utilisant un lentivirus, nous avons voulu évaluer l'efficacité de la transduction et l'influence de cette transduction sur le niveau d'expression de divers gènes. Nous avons quantifié l'expression de ces gènes par PCR en temps réel à l'aide de la technologie TaqMan.

A. La chimie du TaqMan

Lors d'une PCR classique, le fragment d'ADN à amplifier est délimité par un couple d'« amorces » (sens et antisens). La réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible peut être décomposée en 3 phases :

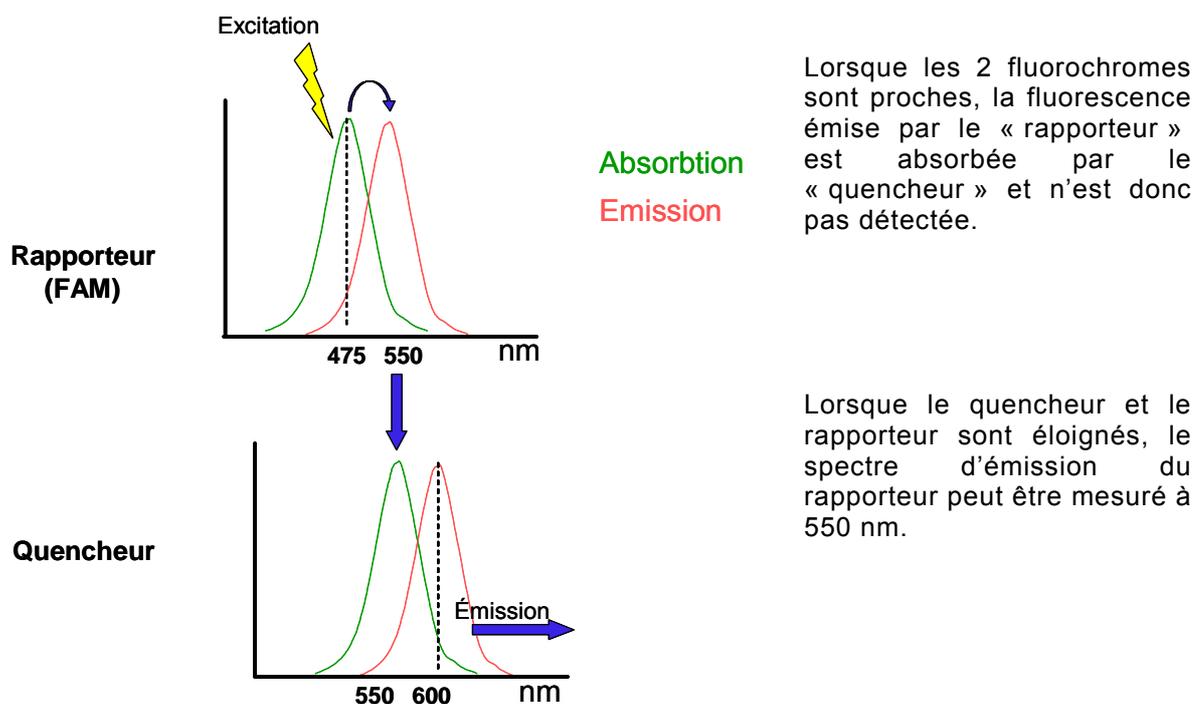
- la phase de dénaturation,
- la phase d'hybridation (ou appariement des amorces),

– la phase d’extension (synthèse du brin complémentaire d’ADN par une polymérase).

Lors d’une PCR en temps réel avec utilisation de la technologie TaqMan, l’amplification du fragment d’ADN d’intérêt se fait toujours à l’aide d’un couple d’amorce, et selon les 3 phases décrites précédemment. Mais on utilise également (1) une sonde « TaqMan » spécifique du fragment d’intérêt et (2) une polymérase particulière : la Taq DNA Polymérase.

- La sonde TaqMan est en fait un oligonucléotide bi-marqué :
- en 5’ par un fluorochrome appelé « rapporteur » (la 6-carboxyfluorescéine ; FAM, Applied Biosystems) et,
- en 3’ par un fluorochrome appelé « quencheur ».
- A l’état basal, le spectre d’émission du fluorochrome « rapporteur » chevauche le spectre d’extinction du « quencheur ». L’émission du fluorochrome est donc atténuée ou « quenchée » (éteinte) par la proximité du quencheur (figure 11).

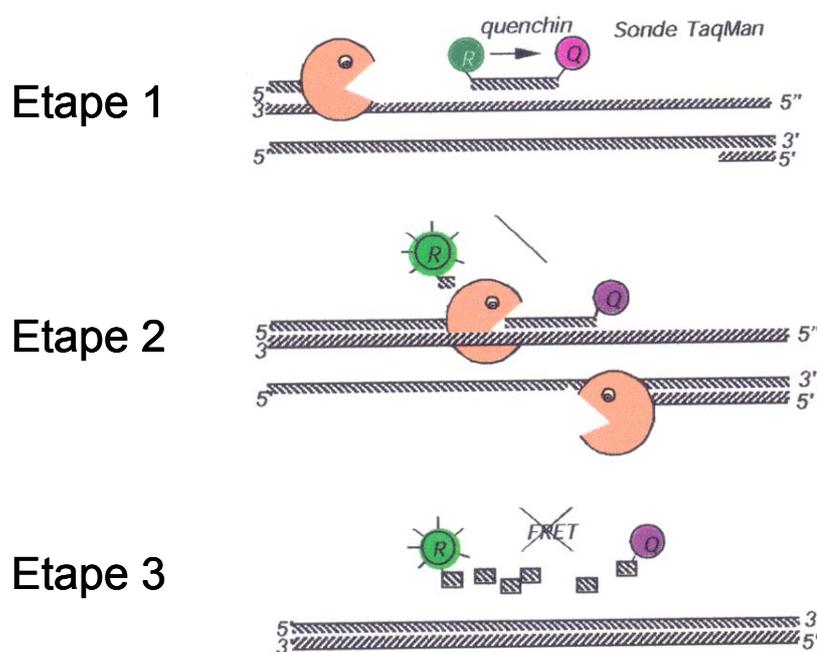
Figure 11 : Spectre d’émission et d’absorption d’une sonde TaqMan.



Lors d'un cycle de PCR en temps réel :

- la phase de dénaturation n'est pas différente de celle de la PCR classique,
- pendant phase d'hybridation, il y a appariement des amorces et de la sonde «TaqMan »,
 - pendant la phase d'extension la Taq DNA polymérase synthétise le brin complémentaire d'ADN et clive l'extrémité 5' de la sonde TaqMan, libérant ainsi le « rapporteur ». Les 2 fluorochromes n'étant alors plus reliés entre eux, la fluorescence émise par le « rapporteur » n'est plus transférée au « quencheur » et l'émission peut alors être mesurée à sa longueur d'onde spécifique (figure 12).

Figure 12 : Les 3 étapes de la chimie TaqMan.



Une sonde fluorescente (ou sonde « TaqMan ») est spécifique d'une partie interne au fragment d'ADN amplifié. Cette sonde est marquée en 5' par une molécule fluorescente appelée « rapporteur » et en 3' par une seconde molécule fluorescente le « quencheur ». De part sa proximité le « quencheur » absorbe la fluorescence du « rapporteur » (étape 1) Au cours de la polymérisation, l'activité 5'-3' de la Taq polymérase dégrade la sonde Taqman (étape 2). Le « rapporteur » n'étant plus attaché au « quencheur », l'émission n'est plus absorbée par le « quencheur » (étape 3). La dégradation de la sonde est proportionnelle à l'augmentation de la fluorescence du « rapporteur » et donc proportionnelle au nombre de copies effectuées. R : « rapporteur », molécule fluorescente excitation : 488 nm ; émission 520 nm. Q : « quencheur », molécule fluorescente excitation : 520 nm ; émission 560 nm.

Ainsi, l'augmentation de la fluorescence détectée est proportionnelle à la dégradation de la sonde et donc proportionnelle au nombre de copies effectuées. L'utilisation de cette sonde fluorescente permet la quantification du nombre de copies formées en temps réel.

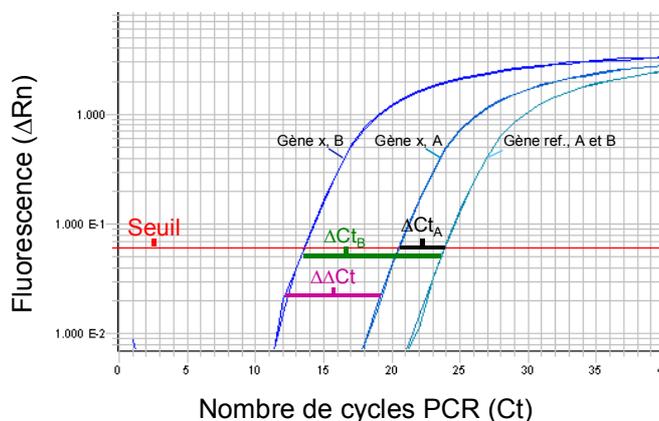
B. La méthode de quantification

La technique de la PCR en temps réel permet de faire une quantification relative de gènes d'intérêt dans des échantillons donnés par rapport à un gène de référence non régulé ou d'évaluer l'expression d'un même gène dans des conditions différentes.

La quantification relative utilise la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) ; figure 13). Le Ct (threshold cycle) correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour atteindre un seuil fixe (threshold) situé dans la phase linéaire de la courbe d'amplification sigmoïdale. Le Ct du gène x est normalisé par un gène de référence (ref) selon la formule $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{ref}$. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans une condition B par rapport à une condition A ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). La transformation des valeurs logarithmiques en échelle linéaire permet enfin d'obtenir les ratios $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le $2^{-\Delta Ct}$ correspond au ratio d'expression d'un gène x par rapport au gène de référence. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ correspond au ratio d'expression du gène x dans une condition expérimentale B par rapport à une condition expérimentale A.

Dans toutes les études présentées, la normalisation des données d'expression relative ou absolue est réalisée par le gène de référence HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase).

Figure 13 : Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Pour chaque condition expérimentale (A et B), le ΔCt est calculé selon la formule : $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{ref.}$, où x correspond au gène analysé, et ref. au gène de référence utilisé pour la normalisation. Le calcul du $\Delta\Delta Ct$ permet ensuite de comparer l'expression du gène x dans la condition B par rapport à la condition A ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_B - \Delta Ct_A$). On notera ici que l'expression du gène de référence est stable entre les deux conditions A et B.

C. Evaluation de l'expression de la Cx43 transduite

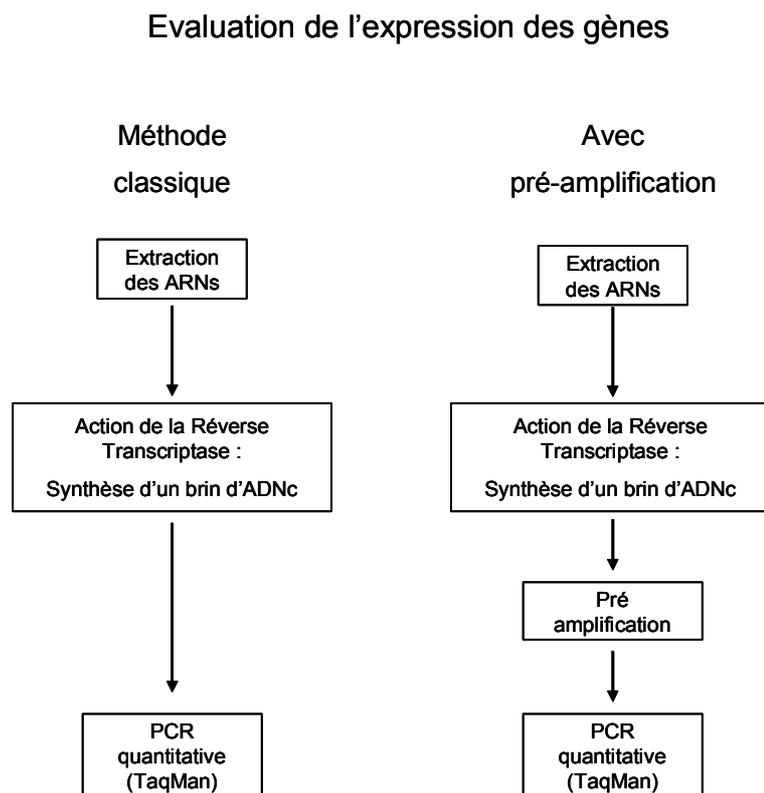
1. *In vitro*

Lors de nos premières expériences de transduction des cultures primaires de myoblastes par un lentivirus codant la Cx43, nous avons voulu évaluer la surexpression de cette protéine par Western Blot. Cependant au niveau des myoblastes la Cx43 est déjà très fortement exprimée, à son niveau basal. Du fait de ce niveau d'expression très élevé avant transduction, les premiers Western Blot réalisés, n'ont pas mis en évidence de surexpression de la Cx43 après transduction.

Puisque les Cx43 natives et Cx43 transduites ne pouvaient être différenciées l'une de l'autre, nous nous sommes intéressés aux ARN messagers natifs et transduits. L'ARN messager de la protéine transduite comporte dans sa partie 5' terminale des séquences post-traductionnelles (séquence Wpre) dont le but est de stabiliser l'ARN. L'ARN messager transduit peut donc être différencié de son homologue natif grâce à la présence de cette séquence Wpre. Il est possible d'évaluer spécifiquement la surexpression de la Cx43 transduite par RT-PCR dirigée contre cette séquence Wpre. Dans ce but, nous avons choisi un couple d'amorce, ainsi qu'une sonde fluorescente capables de se fixer sur les séquences post-traductionnelles codant le Wpre (figure 14).

pre-amp master mix kit) sur les échantillons d'ADN codant, obtenus après la réaction de la « reverse transcriptase » et juste avant de réaliser la PCR en TaqMan (figure 15).

Figure 15 : Protocoles de RT-PCR avec ou sans pré-amplification.



Avec une pré-amplification de la séquence du Wpre avant la PCR TaqMan proprement dite, nous avons détecté l'expression du Wpre dans les myocardes plus de 5 semaines après la transplantation de myoblastes transduits avec la Cx43.

ETUDE I : EVALUATION DE LA STABILITE ELECTRIQUE DU MYOCARDE APRES GREFFE DE MYOBLASTES AUTOLOGUES

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias.

Fernandes S, Amirault JC, Lande G, Nguyen JM, Forest V, Bignolais O, Lamirault G, Heudes D, Orsonneau JL, Heymann MF, Charpentier F, Lemarchand P.

Cardiovasc Res 69: 348-358, 2006.

I. INTRODUCTION

Les 1^{ers} protocoles cliniques de transplantation intramyocardique de myoblastes laissaient suspecter des risques d'arythmies ventriculaires après l'intervention et ce bien qu'aucune étude préclinique n'ait mis en évidence de troubles du rythme après une greffe de myoblastes. Cependant, lors de la réalisation de ces études, les auteurs ne s'étaient intéressés qu'à l'amélioration de la fonction contractile du cœur. Les études électrophysiologiques ont été rares et peu approfondies. Puisque ces troubles du rythme peuvent mettre en jeu le pronostic vital des patients, il nous paraissait important de les évaluer.

Le but de ce travail était donc d'évaluer l'effet d'une transplantation intramyocardique de myoblastes autologues sur la stabilité électrique du myocarde.

Nous avons donc

- (1) mis au point un modèle de rat avec ligature coronaire et greffe intramyocardique de myoblastes autologues
- (2) évalué les troubles du rythme spontanés, puis la stabilité électrique du myocarde à différents temps après une transplantation de myoblastes autologues.

II. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

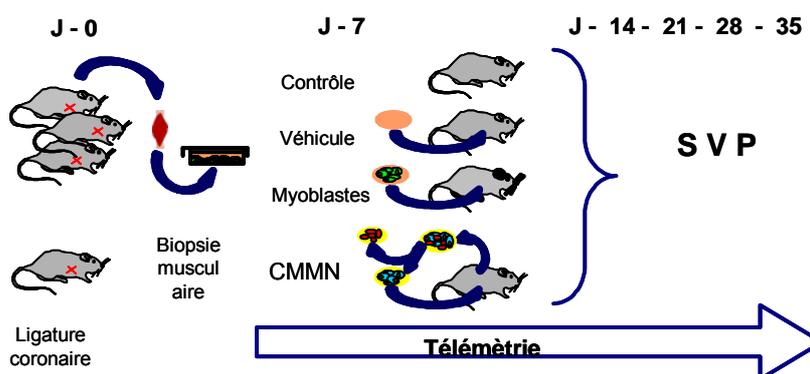
Nous ne détaillerons pas le modèle animal (rats Wistars avec ligature coronaire) qui a été décrit précédemment dans la partie méthodologie.

Pour les études électrophysiologiques proprement dites, 81 animaux ont subi une ligature coronaire, 25 sont morts dans les 48 heures suivant la chirurgie. Sept jours après la ligature coronaire (J+7), les 56 animaux restants ont été randomisés en 3 groupes :

- ✓ un groupe « contrôle » ne recevant pas de traitement supplémentaire,
- ✓ un groupe « véhicule » injecté avec du milieu de culture au niveau de la zone nécrosée et,
- ✓ un groupe « myoblastes » injecté avec des myoblastes autologues au niveau de la zone nécrosée du myocarde.

Afin de réaliser un groupe contrôle supplémentaire, nous avons utilisé des animaux injectés avec des cellules mononucléées de la moelle à J+7, et ce toujours de façon autologue.

Figure 16 : Protocole expérimental utilisé.



Sur ces animaux, des enregistrements d'ECG par télémétrie ont été réalisés entre J0 (juste après la ligature coronaire) et J+35. Des protocoles de Stimulations Ventriculaires Programmées ont été réalisés à J+14, 21, 28 et 35.

III. RESULTATS

Les enregistrements d'ECG par télémétrie ont mis en évidence la présence des tachycardies ventriculaires chez tous les rats, dans les 24h suivant la ligature coronaire. Ces troubles du rythme disparaissent spontanément dans les 48h suivant la ligature coronaire. Une analyse approfondie de ces enregistrements, réalisés entre J+7 et J+35, n'a pas permis de mettre en évidence de différence dans la fréquence d'apparition de troubles du rythme spontanés entre les groupes véhicule (n=5 ; 597h) et myoblastes (n=5 ; 733h). De façon similaire à l'exploration électrophysiologique effectuée en clinique humaine, nous avons réalisé des protocoles de stimulation ventriculaire programmée (SVP) à J+14, J+21, J+28 et J+35 après la ligature. Le pourcentage de rats ayant eu au moins un épisode de tachycardie ventriculaire (TV) pendant les protocoles de SVP était similaire dans les groupes contrôle et véhicule (respectivement 5/17 et 4/19 ; $p=0,50$). A l'inverse, dans le groupe myoblastes 13/20 rats (65%) ont eu au moins un épisode de TV soutenue pendant l'un des protocoles de stimulation ($p<0,05$ et $p<0,005$ versus les groupes contrôle et véhicule). Ces mêmes protocoles de SVP pratiqués sur des rats avec ligature coronaire et injectés avec des cellules mononucléées de la moelle, n'ont pas mis en évidence d'hyperexcitabilité myocardique, suggérant un effet spécifique des myoblastes.

Les résultats obtenus lors des protocoles de SVP suggèrent, dans le groupe myoblastes un aspect transitoire des arythmies avec une incidence maximale dans les 2 semaines suivant la transplantation cellulaire. Un immunomarquage a confirmé la présence des cellules au sein du tissu myocardique plus de 5 semaines après la transplantation.

IV. COMMENTAIRES

Ces résultats ont montré que, sur un modèle de rat : (1) l'injection de véhicule ou de cellules ne favorise pas le déclenchement de tachycardie ventriculaire, (2) la greffe de myoblastes dans un myocarde lésé entraîne une instabilité électrique.

Cette étude confirme le risque d'arythmie après une greffe intramyocardique de myoblastes, et donc souligne l'importance d'un suivi médical rigoureux des patients inclus dans les études de thérapie cellulaire cardiaque. Cette étude souligne également le besoin d'approfondir nos connaissances quant à l'intégration électrophysiologique des cellules transplantées au sein du myocarde. Dans ce cadre les études cliniques randomisées et menées à large échelle seront d'une aide précieuse.

ETUDE II : GREFFE DE MYOBLASTES AUTOLOGUES SUREXPRIMANTS LA CONNEXINE 43 : IMPACT SUR LA STABILITE ELECTRIQUE DU MYOCARDE

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit en préparation.

I. INTRODUCTION

Le couplage électromécanique des cardiomyocytes dépend principalement des jonctions communicantes. Au niveau ventriculaire, la principale protéine exprimée au niveau des jonctions communicantes est la Connexine 43 (Cx43). Une très forte expression de cette Cx43 par les cardiomyocytes ventriculaires permet un couplage électromécanique très efficace et un passage rapide de l'influx électrique d'un cardiomyocyte à l'autre.

De façon intéressante la Cx43 est également très fortement exprimée au niveau des myoblastes, mais cette expression subit une régulation négative lors des processus de fusion et de maturation. Ainsi, au niveau des fibres musculaires matures et contractiles (les myotubes), la Cx43 n'est quasiment plus exprimée. Chaque fibre musculaire est électriquement isolée, et peut se contracter indépendamment des myotubes voisins. Ainsi, la force de contraction d'un muscle peut être modulée en fonction du nombre de fibres musculaires mobilisées. Ce mode d'action est totalement différent de la contraction myocardique où la dépolarisation d'un cardiomyocyte induit la dépolarisation des cardiomyocytes voisins permettant ainsi la propagation de l'onde de dépolarisation dans tout le tissu myocardique.

Lors des études précliniques et cliniques de thérapie cellulaire, il a été montré, qu'une fois injectés au niveau du myocarde, les myoblastes se différencient en myotubes en quelques semaines. Même lorsque cette différenciation a lieu au sein du tissu myocardique, ces myotubes n'expriment pas la Cx43 (Fernandes *et al.*, 2006). De plus, Léobon *et al.* ont mis en évidence qu'*in situ*,

les dépolarisations des cardiomyocytes ne se propageaient pas aux myotubes voisins (Leobon *et al.*, 2003), confirmant l'absence de couplage électromécanique entre ces 2 types cellulaires.

Des études *in vitro* et *ex vivo* ont mis en évidence que la présence de myotubes au sein d'une culture de cardiomyocytes ou d'un tissu myocardique ralentissait la vitesse de propagation de l'influx électrique (Abraham *et al.*, 2005; Fouts *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2006). *In vivo*, des modifications locales de vitesse de propagation de l'influx électrique peuvent induire des hétérogénéités tissulaires et sont autant de facteurs de risque pour le déclenchement d'arythmies et notamment l'induction de phénomènes de réentrée (Antzelevitch, 2001b).

Lors de notre premier travail, nous avons mis en évidence une instabilité électrique du myocarde après transplantation intramyocardique de myoblastes autologues, et exclu l'hypothèse que ces arythmies soient la conséquence de l'instabilité électrique du myocarde créée par le remodelage du myocarde ou par le protocole d'injection. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer le ou les mécanismes impliqués dans ces arythmies.

Dans ce second travail, notre but était d'évaluer la relation entre l'absence d'expression de la Cx43 par des myotubes et l'instabilité électrique du myocarde.

Nous avons donc

(1) mis au point une surexpression stable de la Cx43 dans les cultures primaires de myoblastes de rats

Puis, évalué l'effet de la surexpression de la Cx43 par les myoblastes

(2) sur l'intégration électrophysiologique des cellules musculaires squelettiques au sein du tissu myocardique, ainsi que

(3) sur la stabilité électrique du myocarde.

II. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Pour cette étude les procédures de ligature coronaire, de cultures primaires de myoblastes ou d'injections intramyocardiques sur les rats Wistars sont les mêmes que celles décrites dans la partie méthodologie ou dans l'article précédemment cité (Fernandes *et al.*, 2006).

La surexpression de la Cx43 a été induite *ex vivo*, avant la transplantation par transduction des cultures primaires à l'aide d'un lentivirus contenant la séquence codant la Cx43 de rat. Le lendemain de la ligature coronaire, les cultures primaires de myoblastes ont été randomisées en 3 groupes : un groupe « contrôle » ne subissant pas de traitement, un groupe « Lv-Nul » où les cellules étaient transduites avec le lentivirus non-codant, un groupe « Cx43 » où les cellules étaient transduites avec le lentivirus codant pour la Cx43.

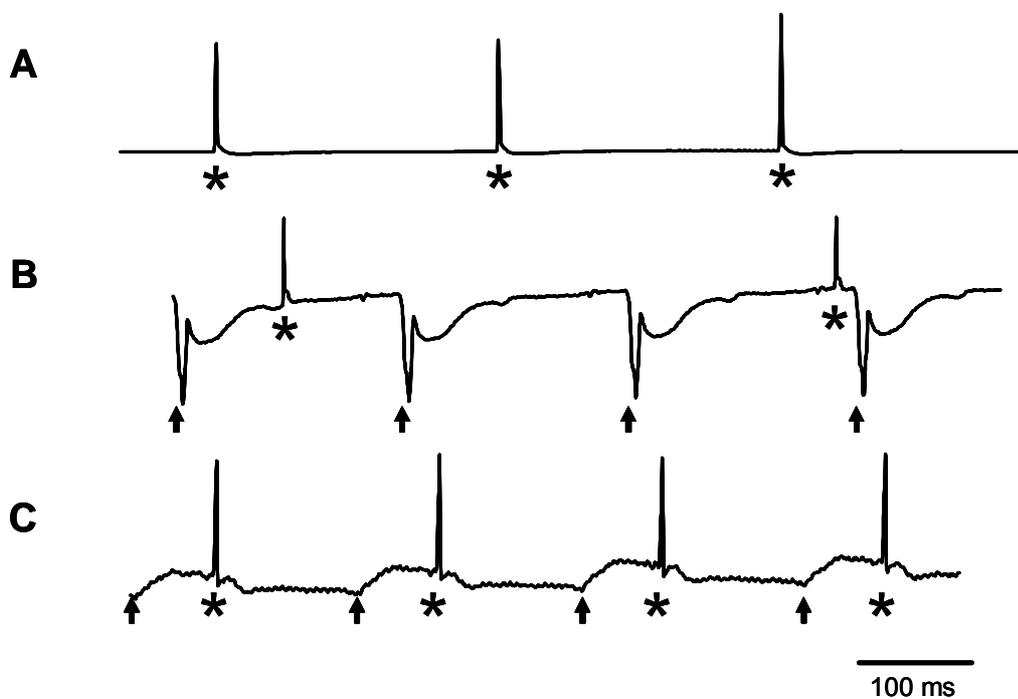
III. RESULTATS

La transduction par le lentivirus codant la Cx43 augmente significativement l'expression de la Cx43 au sein des cultures primaires (2 fois plus d'expression). Cette surexpression de la Cx43 ne modifie ni la prolifération cellulaire, ni la proportion de myoblastes au niveau des cultures primaires. *In vitro*, après transduction par le lentivirus, la surexpression de la Cx43 par les myoblastes reste stable pendant au moins 1 mois. *In vivo*, l'expression du transgène de la Cx43 peut être détectée plus de 8 semaines après la transplantation des myoblastes transduits au sein du myocarde.

Des études *ex vivo* menées sur des myocordes perfusés de rats LV-Nul et Cx43 ont mis en évidence, dans ces deux groupes, des Potentiel d'Action Monophasique (PAM) d'une durée de 5 à 10 ms (*; Figure 17A) et de morphologie comparable à ceux des PAM du muscle squelettique de rat. Ceci suggère que les cellules d'origine squelettique greffées conservent les caractéristiques

électrophysiologiques du muscle squelettique. De plus, si dans le groupe LV-Nul (Figure 17B), les PAM des cellules d'origine squelettique (*) sont indépendants de ceux du tissu myocardique environnant (↑), dans le groupe Cx43 (Figure 17C) les PAM des cellules d'origine squelettique et des cardiomyocytes environnants se déclenchent de façon synchrone. Cette deuxième observation, suggère que la surexpression de la Cx43 permet d'établir un couplage électromécanique entre les cellules musculaires transplantées et les cardiomyocytes hôtes.

Figure 17 : Potentiels d'action monophasique enregistrés en intramural.

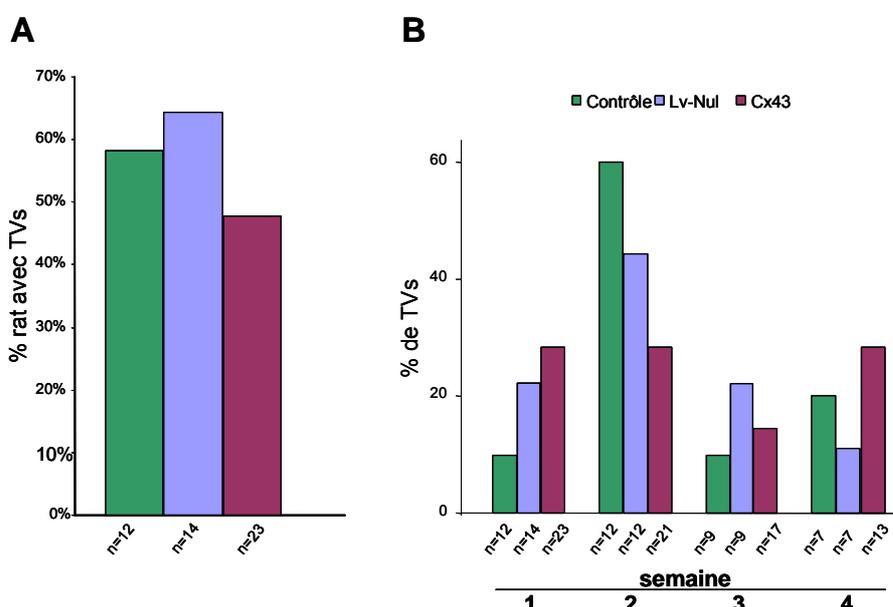


Potentiels d'action monophasique, A : Enregistré sur un tibialis antérieur de rat, B et C Enregistrés en intra mural sur des cœurs perfusés 2 semaines après la transplantation dans les groupes (B) Lv-Nul et (C) Cx43.

Lors des études de stimulation ventriculaire programmée, réalisées *in vivo* dans les mêmes conditions que l'étude précédente, il n'a pas été mis en évidence de différence significative dans le déclenchement tachycardies ventriculaires

soutenues entre les 3 groupes (Figure 18A). Dans les groupes contrôle et Lv-Nul, la proportion de TV soutenue (TVs) déclenchée est maximale 2 semaines après la transplantation de myoblastes, suggérant encore une fois le caractère transitoire de ces arythmies. Cependant, dans le groupe Cx43, les TVs déclenchées sont réparties de façon équivalente entre les 4 protocoles de SVP suggérant que la surexpression de la Cx43 par les cellules musculaires squelettiques a une influence sur la stabilité électrique du myocarde (Figure 18B).

Figure 18 : Arythmies déclenchées lors des protocoles de SVP.



A : Pourcentage de rats ayant eu au moins un épisode de tachycardie ventriculaire soutenue (TVs) au cours d'un des protocoles de stimulation ventriculaire programmée (SVP). B : Pourcentage des TVs déclenchées à chaque protocole de SVP (semaines 1, 2, 3 et 4).

IV. COMMENTAIRES

Ces résultats montrent que, sur un modèle de rat : (1) la surexpression de la Cx43 améliore le couplage électromécanique entre les cellules musculaires transplantées et les cardiomyocytes hôtes mais que (2) cette amélioration n'est, à

elle seule, pas suffisante pour diminuer de façon significative le risque arythmogène secondaire à la greffe de myoblastes autologues. Cependant, si la surexpression de la Cx43 par les cellules musculaires transplantées ne modifie le déclenchement des troubles du rythme dans notre modèle de rat, (3) la cinétique d'installation de cette hyperexcitabilité électrique est cependant modifiée.

**Cardiac Cell Therapy : Cx43 overexpression increases *in vivo*
electromechanical coupling between skeletal myoblasts and cardiomyocytes**

Sarah Fernandes, Harold VM van Rijen, Virginie Forest, Stéphane Evain, Flavien
Charpentier, Jacques MT de Bakker, Patricia Lemarchand.

From L'Institut du Thorax INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, France

Corresponding author: Patricia Lemarchand, MD, PhD, L'Institut du Thorax
INSERM U533, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, F-44035 Nantes cedex 1,
France

Tel: (33) 2 40 41 29 91 Fax: (33) 2 40 41 29 50

patricia.lemarchand@nantes.inserm.fr

Introduction

Cardiovascular cell therapy offers the first real potential to treat the underlying injuries associated with cardiac and vascular diseases. Several phase 1 clinical trials suggested a beneficial effect of autologous skeletal myoblast transplantation in end stage heart failure patients (Menasche *et al.*, 2003; Smits *et al.*, 2003; Siminiak *et al.*, 2004). However, enthusiasm was tempered by a high incidence of malignant ventricular tachycardia (VT) within weeks following transplantation. As a result, administration of the potentially toxic anti-arrhythmic drug amiodarone (Minami *et al.*, 2003), and/or placement of implantable cardioverter defibrillator before myoblast transplantation has been carried out in subsequent clinical trials (Hagege *et al.*, 2006). In a recent study, we demonstrated that myoblast transplantation into the infarcted myocardium forms a specific substrate for arrhythmias, excluding the hypothesis that these arrhythmias result from the natural history of patients with severe ischemic cardiomyopathy (Fernandes *et al.*, 2006). The exact mechanism of these arrhythmias is unknown, but it has been suggested that they result from a lack of electro-mechanical coupling between the skeletal myoblasts and the host cardiomyocytes (Leobon *et al.*, 2003).

Electro-mechanical coupling between ventricular cardiomyocytes depends on Connexin43 expression (Cx43, the main ventricle gap junction protein), resulting in very efficient electrical coupling of the cardiac syncytium. Interestingly, skeletal muscle cells express Cx43 as replicating myoblasts but down regulate its expression progressively upon fusion, mature skeletal myofiber (myotube) formation, and further differentiation. Several preclinical studies have shown that once injected into the heart, myoblasts differentiate into myotubes, and thus, are not coupled to neighboring cardiomyocytes (Leobon *et al.*, 2003; Horackova *et al.*, 2004; Rubart *et al.*, 2004). *In vitro* and *ex vivo* studies have shown that a mixture of myotubes and cardiomyocytes without sufficient functional gap junction results in slower conduction

velocities (Abraham *et al.*, 2005) and greater tissue heterogeneity (Mills *et al.*, 2006). Such heterogeneity predisposes to wave breaks and re-entry, the key elements for inducing ventricular arrhythmias. Reentry occurs when a propagating impulse fails to die out after normal activation of the heart and persists to re-excite the heart after expiration of its refractory period.

To evaluate the role of Cx43 in myoblast related arrhythmogenic risk, we addressed the hypothesis that Cx43 overexpression by lentivirus transduction of the skeletal myoblasts may enhance their electrical coupling to cardiomyocytes, and may therefore decrease electrical instability related to myoblast transplantation.

Methods

All animal experiments were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Experimental model

Intramyocardial injections of autologous myoblasts were performed in Wistar rats (150-175g, Janvier, France), 7 days after coronary ligation into the infarcted area. As previously described, 3 intramyocardial injections (50 μ L each) with a 30 gauge needle, were performed under direct observation via left thoracotomy (Fernandes *et al.*, 2006). Myoblast primary cultures were sourced from tibialis anterior muscles of male Wistar rats as previously described (Pouzet *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2006).

Lentivirus

Lentivirus construction and production

A self-inactivating HIV-derived gene-transfer plasmid (pHR'-CMV-Cx43-W-sin18; Fig. 1A) containing the cDNA for rat Cx43 downstream of the cytomegalovirus (CMV) promoter elements and upstream of the post-transcriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus (Wpre) was kindly provided by Pr P. Meda (Zufferey *et al.*, 1999).

For our controls animals we used a lentivirus containing the same construct, from the pcDNA3.1 but without the Cx43 transgene.

Lentivirus production was performed by the LentiVirus Production Unit (LVPU, Geneva, Switzerland; <http://tronolab.epfl.ch>). Packaging and envelope plasmids (psPAX2 and pMD2G respectively) were also provided by the LVPU.

Lentivirus transduction

Transduction was carried out by adding lentivirus to myoblast primary cultures 24hr after cell isolation. Based on the vector concentration, 4×10^5 TIUs were used to transduce 10^5 cells. Transduced cells were allowed to grow *in vitro* for 6 days before intramyocardial transplantation. As controls, non transduced myoblast primary cultures and myoblast primary cultures transduced with an empty lentivirus were used.

Cx43 over expression

To specifically quantify Cx43 transgene expression both *in vitro*, in myoblast primary cultures, and *in vivo*, in myocardium transplanted with Cx43-transduced myoblastes, we quantified the expression of the post-transcriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus (Wpre), using real time PCR. For such TaqMan quantification, we designed 2 primers (GAG ATT TAA ACC GGC TTG AGC AT and GCA GCG TAT CCA CAT AGC GTA; forward and reverse primers, respectively) and a fluorescent probe (6-Fam-AAT TCC GAT AAT CAA CCT CT-MGB) with nucleotide sequences completing to Wpre cDNA (Fig. 1B; all nucleotides were synthesized by Applied Biosystem).

Real time RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems).

For gene expression evaluation of myocardial tissue, synthesized cDNA was preamplified using TaqMan Preamplification Master Mix Kit (Applied Biosystem) before real time PCR.

On-line PCR was performed with the following primers: desmin (Rn00574732_m1), Cx43 (Rn01433957_m1), and Wpre (described above). Fluorogenic TaqMan probes were labeled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM[®], Applera) on the 5'-end, and with non-fluorescent quencher on the 3'-end (Applied Biosystems). Data were collected with instrument spectral compensations by the Applied Biosystems SDS 2.3 software and analyzed using the threshold cycle (C_T) relative quantification method (Livak and Schmittgen, 2001). The fluorescence signals were normalized to the hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT, Rn01527838_g1), used as reference gene. Specific mRNA quantifications were performed in duplicate. Absence of DNA contamination in isolated RNA samples was verified by performing real time PCR on RNA samples not reverse transcribed.

All data were averaged and then used for the $2^{-\Delta CT}$ calculation. $2^{-\Delta CT}$ corresponds to the ratio of each gene expression *versus* HPRT.

Electrophysiological studies

All electrophysiological studies and analysis of results were performed by blinded operators.

Ex vivo : Intramural monophasic action potential recording

In order to study the mechanisms involved in arrhythmias related to myoblast transplantation, we performed ex vivo electrophysiological studies of rat myocardium injected with myoblasts.

Animals were sacrificed 2 weeks after autologous myoblast transplantation by pentobarbital injection (100mg/kg; ip). To avoid stroke formation animals were injected with heparine at the time of sacrifice (3750 UI/kg; ip). Animal hearts were harvested for Langendorff perfusion with a Krebs modified solution (NaCl 118,3 mM ; KCl 3,8 mM ; MgSO₄ 1,2 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; glucose 11,1 mM ; CaCl₂ 1,25 mM), saturated with carbogen (O₂ 95% et CO₂ 5%) and at 37°C.

Intramural monophasic action potentials were recorded with a tungsten needle electrode during sinus rhythm at 7 different sites (1 located in the right ventricle and 6 located in the left ventricle).

In vivo: Programmed electrical stimulation

To evaluate electrical stability of the myocardium, ventricular programmed electrical stimulation (PES) were performed in vivo, using a previously described protocol (Fernandes *et al.*, 2006). Briefly, an epicardial electrode was tied to the viable left ventricular myocardium during surgery for coronary ligation. For PES stimulation, animals were sedated with a mixture of etomidate (8 mg/kg; i.p.; Hypnomidate[®], Janssen-Cilag) and pentobarbital (40 mg/kg; i.p.; Pentobarbital sodique[®], Cerva Santé Animale). The distal tip of the epicardial electrode was externalized to be used as the negative lead. Another electrode was placed on the thorax to be used as the positive lead, allowing unipolar stimulation (UHS 20, Biotronik). Surface six-lead ECGs were recorded for monitoring and later analyses. Standard criteria were used for interval measurements (RR, PR, QRS and QT).

Standard clinical PES protocols were used, including single, double and triple extrastimuli applied under spontaneous rhythm or following a train of 9 stimuli at 100-ms drive cycle length. The coupling interval of the last extrastimulus was decreased to the ventricular effective refractory period (VERP). Protocols were interrupted if sustained ventricular tachycardia (VT) was induced. Sustained VT was defined as fast ventricular rhythm of 15 or more beats, according to the Lambeth Conventions (Walker *et al.*, 1988).

Data Analyses

Data are expressed as mean \pm SEM and frequencies (expressed as percentages). Statistical analyses were performed using MedCalc 9.1 software. Real time RT-PCR data and cell count data were assessed using the Student t-test. Occurrences of sustained VT were compared with Cox's model and were analyzed as failure time data (rats without event were considered as censored). The assumption of proportional hazards between groups was confirmed, and the group was the unique covariate selected in the Cox's model. Overall mortality between groups was compared using Fisher's exact test.

ECG parameters (P, RR, PR, QRS and QT and VERP values) were assessed by a linear mixed model with random slope and intercept in the control, Lv-Null, and Cx43 groups. The fixed effects were the group and the time. Interaction between group and time was tested but not included in the model (not significant). A p-value <0.05 was considered significant.

Results

One day after coronary ligation and myoblast isolation, myoblast primary cultures were randomized into 3 groups: (1) a control group receiving no further treatment, (2) a Lv-Null group in which myoblast primary cultures were transduced with an empty lentivirus, and (3) a Cx43 group in which myoblast primary cultures were transduced with a lentivirus encoding Cx43. In all groups, animals underwent intramyocardial transplantation of autologous myoblasts 7 after post coronary ligation.

Cx43 overexpression

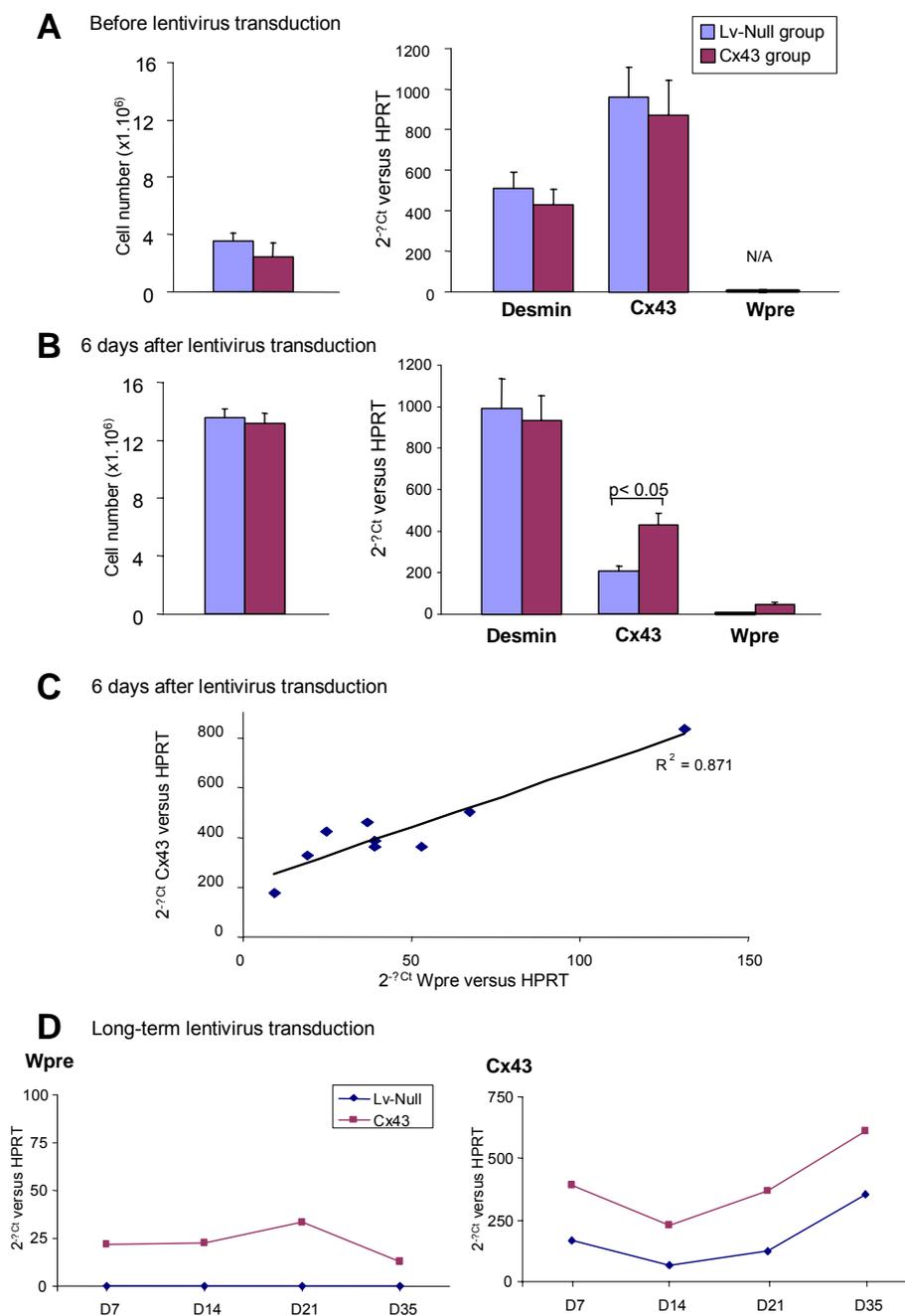
In vitro

Twenty-four hours after myoblast isolation and prior to lentivirus transduction in primary culture, cell counts, expression levels of desmin and Cx43 were all similar in the Lv-Null and Cx43 groups (Fig 2A).

Six days after lentivirus transduction, Cx43 expression level was 2 fold higher in the Cx43 group than in the Lv-Null group ($p < 0.05$) in myoblast primary cultures. Cell count and desmin expression level were similar in both groups. These results suggest that Cx43 overexpression did not modify myoblast expansion (Fig 2B).

To quantify Cx43 expression due to Cx43 lentivirus transduction, quantification of Wpre was performed. Wpre gene expression was detected only in myoblast primary cultures transduced with Cx43 lentivirus. No Wpre expression was detected in both groups before lentivirus transduction or in Lv-Null group 6 days after lentivirus transduction. Moreover, in Cx43 group, 6 days after transduction, total Cx43 gene expression level correlated with the level of Wpre expression ($R^2 = 0.8710$; Fig 2C).

Figure 20 : Characterization of myoblast primary cultures.



A,B Cell counts (left panels) and mRNA expression levels of desmin, Cx43 and Wpre gene expression (right panels) in Lv-Null and Cx43 transduced myoblasts, 24hr after myoblast isolation (A) and 6 days after lentivirus transduction (B). Transcription level are expressed as 2-ΔCt values. C: Correlation between Cx43 and Wpre mRNA expression levels in Cx43 group, 6 days after lentivirus transduction. D: Long-term (from day 7 to day 35 post transduction) Wpre and Cx43 gene expression in Lv-Null and Cx43 transduced myoblasts.

These results confirm that Wpre gene expression is a suitable marker of Cx43 transgene expression.

Long-term *in vitro* studies demonstrated that in Cx43-transduced primary cultures, Wpre gene expression remained stable for more than 1 month after Cx43 transduction. Moreover, 1 month after transduction, Cx43 expression in these culture was still 2 fold higher than in Lv-Null myoblast primary cultures (Fig 2D).

In vivo

Using real time RT-PCR analyses (with cDNA preamplification step) we detected Wpre gene expression in 9/9 myocardium injected with Cx43-transduced myoblasts. Wpre expression could be detected more than 8 weeks after myoblast injection. These results confirm that Cx43-transduced cells still overexpressed Cx43 after *in vivo* transplantation (Table I).

***In vivo* Wpre expression in myocardium transplanted with Cx43 transduced myoblasts.**

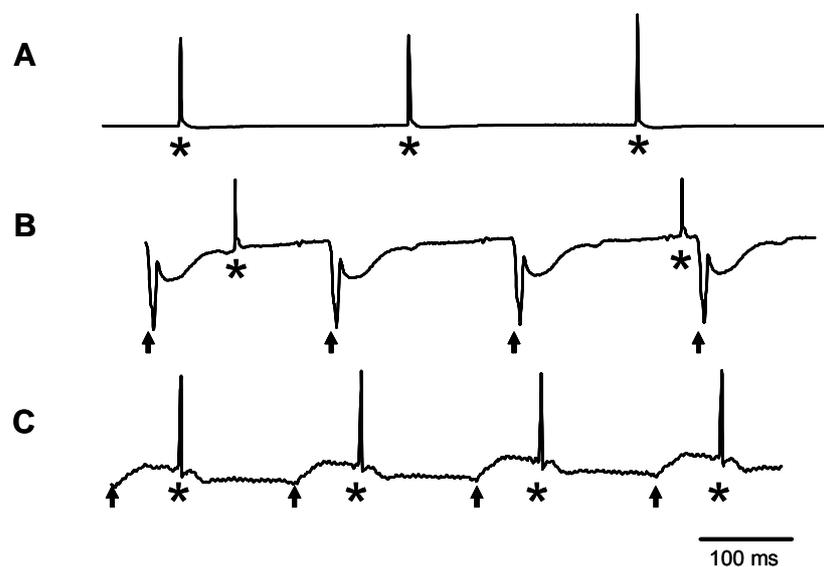
Time after myoblast transplantation	Number of myocardium	
	tested by RT-PCR	with Wpre detected
<4 weeks	3	3
4-5 weeks	5	5
...		
8 weeks	1	1

Electrophysiological analyses

Ex vivo : Intramural monophasic action potential

In order to study arrhythmia the mechanisms related to myoblast transplantation we performed *ex vivo* intramural monophasic action potential recordings in languendorff-perfused hearts from LV-null and Cx43 groups. Two weeks after myoblast transplantation we recorded fast spikes (star) of 5 to 10 ms duration in rat from the LV-null (Fig 3B) and Cx43 (Fig 3C) groups. These monophasic action potentials were similar to monophasic action potentials recorded in rat tibialis muscle (Fig 3A), suggesting that transplanted myoblasts retained electrical properties of skeletal muscle. However, in myocardium transplanted with Cx43-transduced myoblasts, skeletal muscle cells exhibited monophasic action potentials in synchrony with ventricular electrical activation (arrows). Importantly, in myocardium injected with Lv-Null transduced myoblasts (Fig 3B), such synchrony did not occur, suggesting that skeletal muscle cells did not contract in synchrony with host cardiomyocytes.

Figure 21 : Intramural monophasic action potential recording



A: Monophasic action potentials from rat tibialis muscle; stars indicate fast spikes of 5 to 10 ms length, specifics from skeletal muscle. B and C Ex vivo intramural monophasic action potential recorded under sinus rhythm in the infarcted region of the left myocardium 14 days after intramyocardial transplantation of myoblasts in the LV-null (B) and the Cx43 group (C). Ventricular electrical activation is indicated by arrows.

These 5 to 10 ms duration spikes were recorded only in the infarct, where myoblasts were injected. No such spikes were recorded in the right ventricle or in the left ventricle outside the injection zone.

In vivo: Programmed electrical stimulation

Ventricular electrical instability related to cell transplantation was evaluated in all groups using the PES procedure (as described previously by Fernandes *et al.*, 2006).

The PES procedure was conducted at week 1, 2, 3 and 4 post-coronary ligation. No differences between groups were observed in ECG parameters prior to the first PES procedure (week 1). Neither standard ECG measurements, nor VERP at 100-ms pacing cycle length, were significantly altered by the repeated PES procedures (Table II), suggesting that lentivirus transduction or Cx43 overexpression in transplanted myoblasts do not modify ECG parameters.

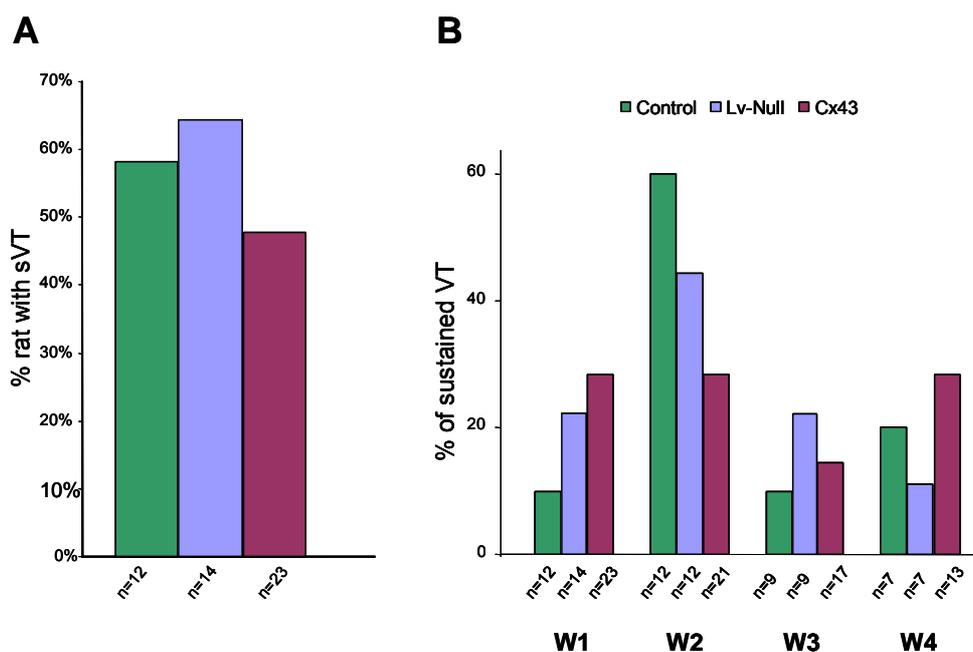
ECG parameters and VERP values

Time	Groups	ECG parameters (ms)					
		RR	P	PR	QRS	QT	VERP
Week 1	Control	154±3.9	19±0.6	48±0.7	21±0.9	84±3.9	69±3.2
	Lv-Null	158±3.6	19±0.5	50±1.6	21±0.7	83±2.8	65±3.5
	Cx43	156±2.9	18±0.3	48±1.5	22±1.2	84±1.7	59±1.7
Week 2	Control	151±4.0	20±0.7	49±0.9	21±0.8	86±3.0	59±2.9
	Lv-Null	158±4.4	19±0.5	50±1.9	21±0.5	86±2.9	65±5.6
	Cx43	150±2.3	18±0.3	48±1.0	20±0.6	80±1.5	62±3.5
Week 3	Control	150±2.6	18±0.6	47±0.9	21±0.8	84±2.1	68±3.4
	Lv-Null	152±3.4	18±0.5	48±1.3	21±0.5	84±1.9	59±4.6
	Cx43	149±2.8	18±0.4	48±1.0	21±0.7	80±2.2	60±2.4
Week 4	Control	152±2.2	19±0.5	49±1.7	19±1.3	85±2.3	61±2.1
	Lv-Null	157±4.6	20±0.4	50±1.5	22±0.7	84±1.8	52±3.6
	Cx43	149±3.9	18±0.5	48±1.1	21±0.8	83±1.6	61±2.4

ECG measurements were performed under sinus rhythm. Ventricular Effective Refractory Period as measured at basic pacing cycle length (BCL) of 100ms at week 1, 2, 3 and 4 after myoblast transplantation. Abbreviations are: P, P wave duration; RR, PR, QRS and QT are RR, PR, QRS and QT intervals, respectively; VERP, Ventricular effective refractory period. All measurements were performed on lead I under general anaesthesia. Results are expressed as mean±SEM.

The percentage of animals experiencing at least one episode of sustained VT during one of the 4 PES procedures was not statistically different between groups (58%, 64% and 48% for the control, Lv-Null and Cx43 groups, respectively; Fig 4A). In each group, ECG parameters of rats that underwent sustained VT during PES did not differ from those that did not show sustained VT (not illustrated). These data suggest that ECG parameters (and more particularly QRS duration) are not a predictive factor of arrhythmia induction.

Figure 22 : Ventricular hyperexcitability.



Rats underwent Programmed Electrical Stimulation (PES) procedure (A): Total number of rats with at least 1 episode of sustained ventricular tachycardia (VT). B: Percentage of overall triggered sustained VT at each time of PES (weeks 1, 2, 3, and 4 after myoblast transplantation).

In transplanted animals from the control and Lv-Null groups, occurrence of triggered sustained VT was maximal 2 weeks after myoblast transplantation

suggesting that increased arrhythmia susceptibility in these groups was transient. In fact, in these groups, 60% and 44% of the overall arrhythmias were triggered in week 2 (in control and Lv-Null group respectively). In contrast, in the Cx43 group, the percentage of triggered sustained VT was similar between the 4 PES procedures (28%, 28%, 15 %, and 28% for the week 1, 2, 3, and 4 respectively; Fig 4B). These results suggest that Cx43 overexpression in transplanted myoblasts modified electrophysiological properties of the transplanted myocardium.

Acknowledgements

We thank Pr P. Meda for the plasmid encoding for Cx43. Lentivirus production was performed by the LentiVirus Production Unit. This work was supported in part by INSERM avenir grant, by the Association Française contre les Myopathies and by the GIS-maladies rares. Sarah Fernandes had a financial support from Association Française contre les Myopathies.

Bibliography

- ABRAHAM, M.R., HENRIKSON, C.A., TUNG, L., CHANG, M.G., AON, M., XUE, T., LI, R.A., B, O.R., and MARBAN, E. (2005). Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res* **97**, 159-167.
- FERNANDES, S., AMIRAUULT, J.C., LANDE, G., NGUYEN, J.M., FOREST, V., BIGNOLAIS, O., LAMIRAUULT, G., HEUDES, D., ORSONNEAU, J.L., HEYMANN, M.F., CHARPENTIER, F., and LEMARCHAND, P. (2006). Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* **69**, 348-358.
- HAGEGE, A.A., MAROLLEAU, J.P., VILQUIN, J.T., ALHERITIERE, A., PEYRARD, S., DUBOC, D., ABERGEL, E., MESSAS, E., MOUSSEAU, E., SCHWARTZ, K., DESNOS, M., and MENASCHE, P. (2006). Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* **114**, 1108-1113.
- HORACKOVA, M., ARORA, R., CHEN, R., ARMOUR, J.A., CATTINI, P.A., LIVINGSTON, R., and BYCZKO, Z. (2004). Cell transplantation for treatment of acute myocardial infarction: unique capacity for repair by skeletal muscle satellite cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H1599-1608.
- LEOBON, B., GARCIN, I., MENASCHE, P., VILQUIN, J.T., AUDINAT, E., and CHARPAK, S. (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7808-7811.
- LIVAK, K.J., and SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- MENASCHE, P., HAGEGE, A.A., VILQUIN, J.T., DESNOS, M., ABERGEL, E., POUZET, B., BEL, A., SARATEANU, S., SCORSIN, M., SCHWARTZ, K., BRUNEVALL, P., BENBUNAN, M., MAROLLEAU, J.P., and DUBOC, D. (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **41**, 1078-1083.
- MILLS, W.R., MAL, N., KIEDROWSKI, M.J., UNGER, R., FORUDI, F., POPOVIC, Z.B., PENN, M.S., and LAURITA, K.R. (2006). Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*.
- MINAMI, E., REINECKE, H., and MURRY, C.E. (2003). Skeletal muscle meets cardiac muscle. Friends or foes? *J Am Coll Cardiol* **41**, 1084-1086.
- POUZET, B., VILQUIN, J.T., HAGEGE, A.A., SCORSIN, M., MESSAS, E., FISZMAN, M., SCHWARTZ, K., and MENASCHE, P. (2000). Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation* **102**, III210-215.
- RUBART, M., SOONPAA, M.H., NAKAJIMA, H., and FIELD, L.J. (2004). Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* **114**, 775-783.

- SIMINIAK, T., KALAWSKI, R., FISZER, D., JERZYKOWSKA, O., RZEZNICZAK, J., ROZWADOWSKA, N., and KURPISZ, M. (2004). Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* **148**, 531-537.
- SMITS, P.C., VAN GEUNS, R.J., POLDERMANS, D., BOUNTIOUKOS, M., ONDERWATER, E.E., LEE, C.H., MAAT, A.P., and SERRUYS, P.W. (2003). Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* **42**, 2063-2069.
- WALKER, M.J., CURTIS, M.J., HEARSE, D.J., CAMPBELL, R.W., JANSE, M.J., YELLON, D.M., COBBE, S.M., COKER, S.J., HARNESS, J.B., HARRON, D.W., and ET AL. (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* **22**, 447-455.
- ZUFFEREY, R., DONELLO, J.E., TRONO, D., and HOPE, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**, 2886-2892.

DISCUSSION GENERALE

Les premières études cliniques ont suggéré la faisabilité et l'efficacité de la greffe de myoblastes autologues comme traitement de l'insuffisance cardiaque. Cependant, ces études cliniques ont également mis en évidence la présence de tachycardies ventriculaires dans les semaines suivant la transplantation.

Dans ce travail, à l'aide d'un modèle animal, nous avons évalué (1) la stabilité électrique du cœur après la transplantation de myoblastes autologues et (2) les mécanismes potentiellement impliqués dans les arythmies secondaires à la greffe de myoblastes.

La première partie de notre travail a montré que, sur un modèle de rat, la greffe de myoblastes autologues induit une instabilité électrique du myocarde pouvant favoriser le déclenchement d'arythmies ventriculaires. A l'inverse, l'injection de véhicule ou de cellules dérivées de la moelle, réalisées dans les mêmes conditions, ne favorise pas le déclenchement de troubles du rythme. De plus, dans notre modèle tout comme lors des essais cliniques, ces arythmies semblent être transitoires avec une hyperexcitabilité électrique du myocarde maximale 2 semaines après la transplantation. Notre travail souligne également le fait que l'analyse d'ECG enregistrés par télémétrie ne soit pas une méthode suffisamment discriminante pour évaluer le risque arythmogène dans un modèle de rat.

Notre deuxième travail a mis en évidence l'amélioration du couplage électrique entre les cellules musculaires transplantées et les cardiomyocytes hôtes grâce à la surexpression de la Cx43 par les myoblastes. Cette amélioration du couplage n'est cependant pas suffisante pour diminuer de façon significative le risque arythmogène secondaire à la transplantation de myoblastes autologues. Néanmoins, si la surexpression de la Cx43 par les cellules musculaires transplantées ne modifie pas le déclenchement des troubles du rythme dans notre modèle de rat, la cinétique d'installation de l'hyperexcitabilité électrique est modifiée. Ce dernier résultat suggère que l'absence de Cx43 joue un rôle dans les troubles du rythme observés lors des protocoles cliniques de transplantation intramyocardique de myoblastes.

I. IMPORTANCE DES METHODES D'EVALUATION DES ARYTHMIES

La première étude électrophysiologique réalisée dans un modèle de souris n'a pas mis en évidence d'augmentation d'arythmie spontanée après la transplantation de myoblastes autologues (Koh *et al.*, 1993). Dans cette étude, l'absence de lésion au niveau du myocarde et l'anesthésie utilisée pendant les périodes d'enregistrement des ECG pouvaient diminuer le risque arythmogène des animaux. Ces arythmies étant des évènements aléatoires, il est vraisemblable que des enregistrements d'ECG réalisés sur de courtes périodes, comme dans l'étude de Koh *et al.*, ne soient pas suffisants pour les détecter. Cependant, lors de notre première étude, l'enregistrement de plusieurs centaines d'heures d'ECG sur des animaux vigiles et avec une lésion cardiaque n'ont pas mis en évidence le déclenchement de tachycardies ventriculaires chez les animaux transplantés. Ces résultats suggèrent que chez le petit animal le risque arythmogène lié à la transplantation cellulaire ne peut être évalué par simple enregistrement d'ECG de l'activité cardiaque basale.

Des ECG enregistrés dans de plus gros modèles animaux (tels que les chiens avec une cardiomyopathie congénitale (Borenstein *et al.*, 2002) ou les lapins avec une lésion cryogénique au niveau du myocarde (Soliman *et al.*, 2003)) ont mis en évidence une augmentation de la fréquence et de la sévérité des troubles du rythme, dans les jours suivant la transplantation intramyocardique de myoblastes. Toutefois, dans ces études, tout comme lors des premiers essais cliniques, il n'y avait pas de groupe contrôle. Or l'insuffisance cardiaque, ou la lésion induite par la procédure d'injection peuvent elles aussi favoriser le déclenchement de troubles du rythme. Dans ces conditions, il est difficile d'établir une relation directe entre la transplantation de myoblastes et les arythmies observées à partir de ces études.

La différence entre les résultats obtenus dans les rongeurs et dans des plus gros modèles animaux peut-être expliquée par la résistance des rongeurs aux phénomènes arythmogènes, décrit dès 1914 par Garrey. De part sa petite taille, le myocarde des rongeurs présente une résistance naturelle à l'installation de fibrillation ou de tachycardie ventriculaire (Garrey, 1914; Janse *et al.*, 1998). De

plus, lors du déclenchement d'une arythmie ventriculaire, le rythme sinusal très rapide chez les rongeurs est capable de prendre le pas sur le foyer arythmogène (Nerbonne, 2004). Ainsi, comme nous l'avons observé lors de notre première étude, le rat peut récupérer spontanément d'une fibrillation ventriculaire, alors que ce trouble du rythme est fatal chez l'homme. Bien que les modèles de rongeurs soient connus pour leur faible fréquence d'arythmie, leur utilisation est courante et souvent indispensable, notamment celle des souris génétiquement modifiées (Janse *et al.*, 1998; Nerbonne, 2004).

Afin d'étudier non seulement les arythmies spontanées, mais également l'instabilité électrique du myocarde après une transplantation de myoblastes, nous avons mis au point un modèle *in vivo* de stimulation ventriculaire programmée (SVP). Avec une procédure peu invasive, nous pouvons répéter les protocoles de SVP sur le même animal et suivre les cinétiques d'évolution de l'instabilité électrique pendant 1 mois suivant la greffe de myoblastes autologues. Nous avons ainsi pu mettre en évidence le caractère transitoire de l'instabilité électrique liée à la transplantation intramyocardique de myoblastes. Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser des méthodes d'études adaptées aux rongeurs pour l'évaluation du risque arythmogène dans ces modèles animaux. Cette observation est importante non seulement pour les études de thérapie cellulaire (ou génique) mais également pour tous les autres protocoles visant à évaluer le risque arythmogène dans des modèles animaux de petite taille (modèle de souris génétiquement modifiées ; (Gutstein *et al.*, 2003).

L'étude des paramètres électrophysiologiques (plus particulièrement de la largeur du complexe QRS et des périodes réfractaires) a montré que sur notre modèle ces paramètres n'étaient pas des facteurs prédictifs de l'instabilité électrique cardiaque. Dans certains modèles de transplantation cellulaire, on observe des variations de la vitesse de conduction électrique (un facteur de risque pour le déclenchement des arythmies) sans modification des périodes réfractaires (Chen *et al.*, 2006). Ceci souligne une fois encore la nécessité d'utiliser des paramètres pertinents et adaptés aux modèles étudiés pour évaluer le risque arythmogène.

II. LES MYOBLASTES : UN SUBSTRAT ARYTHMOGENE

Lors des protocoles de thérapie génique ou cellulaire, il est fréquent d'observer une inflammation locale due à des phénomènes de nécrose et/ou d'apoptose induits par les protocoles d'injections (Bottino *et al.*, 2003). En thérapie cellulaire cardiaque, la procédure d'injection intramyocardique induit une inflammation locale voire des lésions tissulaires pouvant perturber l'électrophysiologie du myocarde (Ben-Dor *et al.*, 2006). Cependant dans notre étude, l'injection de véhicule n'augmente pas l'instabilité électrique du myocarde, ce qui suggère que l'inflammation due à la procédure d'injection en elle-même n'est pas arythmogène.

L'injection intramyocardique des myoblastes autologues entraîne une distribution très inégale des cellules au sein du tissu myocardique pouvant induire une hétérogénéité tissulaire, ce qui représente en lui-même un facteur de risque d'arythmie. Cependant même lorsque les myoblastes sont injectés par voie coronaire (ce qui induirait une répartition des cellules plus homogène au sein du tissu myocardique), on observe une instabilité électrique de l'organe (Chen *et al.*, 2006). L'absence d'arythmie avec ce type cellulaire a été confirmée par des études précliniques (Mills *et al.*, 2006) et a déjà été observée lors des essais cliniques (Makkar *et al.*, 2003). Toutes ces observations suggèrent que les arythmies secondaires à la greffe de myoblastes autologues sont bien liées à la présence de cellules musculaires squelettiques au sein du tissu myocardique.

Dans notre étude, au moment de la transplantation intramyocardique, seulement 25% des cellules présentes au sein des cultures primaires sont réellement des myoblastes. Une hypothèse est que les cellules « non-myogéniques » présentes dans les cultures primaires pourraient former un substrat arythmogène, une fois injectées au sein du myocarde. Ce pourcentage de myoblastes est similaire aux pourcentages observés dans les cultures primaires de rat réalisées par d'autres équipes (Al Attar *et al.*, 2003). A l'inverse chez l'homme ce pourcentage est compris entre 50 et 80% (Menasche *et al.*, 2003; Pagani *et al.*, 2003; Smits *et al.*, 2003), ce qui suggère que le pourcentage de myoblastes n'influe

pas sur le déclenchement des arythmies secondaires à la transplantation de myoblastes autologues.

Les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la fonction contractile secondaire à la greffe de myoblastes ne sont pas clairement définis. La sécrétion de facteurs de croissance par les myoblastes (tels que IGF1 (Cheema *et al.*, 2005) ou SDF1 (Askari *et al.*, 2003)) pourrait favoriser la mobilisation et/ou la différenciation de progéniteurs cardiaques (Abraham and Hare, 2006; Kolettis, 2006). Mais, ces facteurs de croissance peuvent également induire une hypertrophie des cardiomyocytes et modifier leurs caractéristiques électrophysiologiques, entraînant l'instabilité électrique du myocarde (Kolettis, 2006). La sécrétion de facteurs de croissance par les myoblastes pourraient donc jouer un rôle dans les arythmies observées après la transplantation (Chen *et al.*, 2006). Cependant, une étude récente a mis en évidence que la surexpression de SDF1 par les myoblastes potentialisait les effets bénéfiques de la transplantation cellulaire sur la fonction contractile sans pour autant augmenter ou diminuer le risque arythmogène induit par l'injection de ces mêmes myoblastes (Deglurkar *et al.*, 2006). Lors de notre première étude nous n'avons pas observé de différence d'hypertrophie cardiaque entre les myocordes injectés et non injectés. Bien que nos résultats soient à prendre avec précaution du fait du faible nombre d'animaux inclus, les résultats des autres études précliniques publiées vont dans le sens d'une diminution de l'hypertrophie cardiaque après le greffe de myoblastes (Dowell *et al.*, 2003) suggérant que les arythmies observées ne sont pas liées à l'aggravation de l'hypertrophie cardiaque (Kolettis, 2006).

La présence de cellules d'origine musculaire squelettique au sein du tissu myocardique diminue la vitesse de conduction de l'influx électrique (Chen *et al.*, 2006; Fouts *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2006). A l'inverse la présence de cellules dérivées de la moelle au sein du tissu myocardique, ne modifie pas cette vitesse de conduction (Mills *et al.*, 2006) et, bien que dans les 2 cas l'effet bénéfique de la transplantation sur la fonction cardiaque soit similaire, seule la transplantation de myoblastes augmente les arythmies de façon significative. A l'inverse la

transplantation de cellules mésenchymateuses semble protéger le myocarde du risque arythmogène (Mills *et al.*, 2006). Un ralentissement de la vitesse de conduction au niveau du tissu myocardique étant un facteur de risque pour le déclenchement des arythmies (Antzelevitch, 2001a), ceci suggère plutôt un effet électrique des myoblastes dans le risque arythmogène secondaire à la transplantation de myoblastes autologues.

En utilisant un modèle de co-culture, Abraham *et al.* ont mis en évidence le fait que la présence de myoblastes au sein d'une culture de cardiomyocytes diminuait la vitesse de propagation de l'influx électrique et induisait le déclenchement de phénomènes de réentrée (Abraham *et al.*, 2005). La fréquence de ces arythmies est diminuée lorsque les myoblastes surexpriment la Cx43. L'hypothèse quant à l'origine des troubles du rythme observé après une transplantation de myoblastes est que le manque de couplage électromécanique créerait des « barrières » au passage de l'influx électrique en diminuant localement la vitesse de propagation et en entraînant des phénomènes de rupture de l'onde de propagation de l'influx électrique, facteurs de risque pour l'apparition de réentrées et pour le déclenchement d'arythmies.

III. SUREXPRESSIION DE LA Cx43

Lors de notre second travail nous avons mis en évidence que la surexpression de la Cx43 dans les myoblastes, favorise le couplage électrique entre ces cellules et les cardiomyocytes hôtes. Les potentiels d'action très brefs enregistrés au niveau de la zone infarctée et injectée avec les myoblastes confirment que les cellules transplantées conservent les caractéristiques des cellules musculaires squelettiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Léobon *et al.* qui ont montré que, 28 jours après la transplantation, les cellules musculaires squelettiques transplantées conservaient un potentiel d'action de durée similaire à celui observé au niveau des muscles squelettiques (Leobon *et al.*, 2003).

Le potentiel d'action très bref des myotubes des tibialis de rat est normalement suivi par une post-hyperpolarisation lente. La forme des potentiels

d'action n'est pas modifiée par la différenciation des myoblastes au sein du milieu myocardique. Mais lorsque la Cx43 est surexprimée, et que les myotubes sont électriquement couplés aux cardiomyocytes, leurs potentiels d'action, toujours très brefs sont alors suivis d'une rapide post-dépolarisation et d'une lente post-hyperpolarisation, suggérant un possible remodelage de ces cellules.

Après leur transplantation les myotubes sont électriquement isolés des cardiomyocytes environnants, suggérant que l'amélioration de la fonction soit indépendante de leur intégration électrique. Cependant, la synchronisation de leur contraction avec celles des cardiomyocytes hôtes pourrait permettre une potentialisation de l'effet bénéfique de la thérapie cellulaire. Des études précliniques évaluant la fonction contractile du myocarde après greffe de myoblastes surexprimant ou non la Cx43 et permettraient d'éclaircir le mode d'action de ces myoblastes.

Malgré une amélioration du couplage électrique entre les 2 types cellulaires, nous n'observons pas de diminution significative des troubles du rythme lorsque la Cx43 est surexprimée. Des expériences préliminaires réalisées sur notre modèle n'ont pas pu mettre en évidence de différence de vitesse de conduction de l'influx électrique en présence ou non de la Cx43. Ces résultats sont en désaccord avec les études *in vitro* (Abraham *et al.*, 2005) et *in vivo* (Chen *et al.*, 2006; Fouts *et al.*, 2006) qui ont mis en évidence un ralentissement de la propagation de l'influx électrique en présence de myoblastes. Cependant, dans ces études, ces variations de vitesse de conduction sont observées très localement au niveau des sites d'injections des myoblastes, et nous ne disposons pas dans notre modèle de méthode permettant de localiser avec précision ces points d'injections. Il est possible que notre méthode de mesure n'ait pas été assez précise pour mettre en évidence les effets délétères de la présence de myoblastes sur la propagation de l'influx électrique.

La localisation des cellules injectées est cependant un point important dans les études d'arythmies liées à la thérapie cellulaire. Il semblerait que l'injection de myoblastes en bordure des zones infarctées provoque des arythmies alors que ces mêmes injections réalisées au centre de la zone infarctée ne déclenchent pas

d'arythmies (Smits, 2004; Soliman *et al.*, 2004). Au vu de la taille de notre modèle et de la difficulté à localiser précisément les zones avec les cellules nous n'avons pas pu établir de relation entre la localisation des cellules transplantées et les arythmies observées. Des études réalisées sur des modèles animaux plus gros seraient nécessaires pour répondre à cette question. Jusqu'à présent, dans les essais cliniques, les injections de myoblastes autologues sont réalisées à la fois en bordure de la zone infarctée et au centre de l'infarctus (Menasche *et al.*, 2001; Chachques *et al.*, 2002).

Lors de nos 2 études nous avons mis en évidence un pic d'hyperexcitabilité du myocarde 2 semaines après l'injection des myoblastes, un phénomène transitoire qui est également observé en clinique. Après transplantation de myoblastes on observe les premiers myotubes différenciés après la première semaine suivant la greffe (Chedrawy *et al.*, 2002). Il est donc possible que la différenciation, et/ou la fusion des myoblastes en myotubes, entraînent des modifications électrophysiologiques ou mécaniques locales augmentant transitoirement l'hyperexcitabilité cardiaque.

Lorsque les myoblastes transplantés surexpriment la Cx43, le déclenchement des troubles du rythme est réparti de façon égale entre les 4 dates de stimulation. Or la surexpression de la Cx43 par les myoblastes modifie la cinétique de différenciation, et/ou de fusion de ces cellules (Suzuki *et al.*, 2001; Reinecke *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer la répartition plus homogène des troubles du rythme durant le premier mois suivant la transplantation. Une quantification précise des myotubes différenciés présents à différents temps après la transplantation pourrait apporter une réponse à cette question.

Lors de notre première étude, nous avons montré qu'une greffe de myoblastes autologues chez des rats avec infarctus du myocarde augmentait significativement le déclenchement de TV (65% comparé à 29% chez des rats avec infarctus mais non transplantés ; le nombre d'animaux étant respectivement de 20 et 17 dans chacun des groupes). Lors de notre deuxième étude les pourcentages de rats avec arythmie sont de 58% (n=12) pour le groupe contrôle et de 64% (n=14)

pour le groupe Lv-Nul. Le pourcentage global d'arythmie observé dans les 3 groupes transplantés avec des myoblastes ne surexprimant pas la Cx43 est de 63% (n=46). Lors de la surexpression de la Cx43 dans les myoblastes les arythmies ne sont déclenchées que dans 48% des animaux (n=23). Ce résultat suggère que l'absence de couplage électrique entre les 2 types cellulaires puisse favoriser le déclenchement des troubles du rythme, mais que ce manque de couplage ne soit pas le seul mécanisme responsable du risque arythmogène.

BIBLIOGRAPHIE

- ABRAHAM, M.R., and HARE, J.M. (2006). Is skeletal myoblast transplantation proarrhythmic? The jury is still out. *Heart Rhythm* **3**, 462-463.
- ABRAHAM, M.R., HENRIKSON, C.A., TUNG, L., CHANG, M.G., AON, M., XUE, T., LI, R.A., B, O.R., and MARBAN, E. (2005). Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res* **97**, 159-167.
- ACKER, M.A., HAMMOND, R.L., MANNION, J.D., SALMON, S., and STEPHENSON, L.W. (1987). Skeletal muscle as the potential power source for a cardiovascular pump: assessment in vivo. *Science* **236**, 324-326.
- AGBULUT, O., COIRAULT, C., NIEDERLANDER, N., HUET, A., VICART, P., HAGEGE, A., PUCEAT, M., and MENASCHE, P. (2006). GFP expression in muscle cells impairs actin-myosin interactions: implications for cell therapy. *Nat Methods* **3**, 331.
- AGBULUT, O., VANDERVELDE, S., AL ATTAR, N., LARGHERO, J., GHOSTINE, S., LEOBON, B., ROBIDEL, E., BORSANI, P., LE LORC'H, M., BISSERY, A., CHOMIENNE, C., BRUNEVAL, P., MAROLLEAU, J.P., VILQUIN, J.T., HAGEGE, A., SAMUEL, J.L., and MENASCHE, P. (2004). Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* **44**, 458-463.
- AL ATTAR, N., CARRION, C., GHOSTINE, S., GARCIN, I., VILQUIN, J.T., HAGEGE, A.A., and MENASCHE, P. (2003). Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* **58**, 142-148.
- ANTZELEVITCH, C. (2001a). Basic mechanisms of reentrant arrhythmias. *Curr Opin Cardiol* **16**, 1-7.
- ANTZELEVITCH, C. (2001b). Molecular biology and cellular mechanisms of Brugada and long QT syndromes in infants and young children. *J Electrocardiol* **34 Suppl**, 177-181.
- ASKARI, A.T., UNZEK, S., POPOVIC, Z.B., GOLDMAN, C.K., FORUDI, F., KIEDROWSKI, M., ROVNER, A., ELLIS, S.G., THOMAS, J.D., DICORLETO, P.E., TOPOL, E.J., and PENN, M.S. (2003). Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* **362**, 697-703.
- ATKINS, B.Z., LEWIS, C.W., KRAUS, W.E., HUTCHESON, K.A., GLOWER, D.D., and TAYLOR, D.A. (1999). Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ. *Annals of Thoracic Surgery* **67**, 124-129.
- AZARNOUSH, K., MAUREL, A., SEBBAH, L., CARRION, C., BISSERY, A., MANDET, C., POULY, J., BRUNEVAL, P., HAGEGE, A.A., and 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**, 173-179.

- BALDWIN, K.M., and HADDAD, F. (2001). Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* **90**, 345-357.
- BARBASH, I.M., CHOURAQUI, P., BARON, J., FEINBERG, M.S., ETZION, S., TESSONE, A., MILLER, L., GUETTA, E., ZIPORI, D., KEDES, L.H., KLONER, R.A., and LEOR, J. (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* **108**, 863-868.
- BEAUCHAMP, J.R., MORGAN, J.E., PAGEL, C.N., and PARTRIDGE, T.A. (1999). Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* **144**, 1113-1122.
- 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., and ANVERSA, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763-776.
- BEN-DOR, I., FUCHS, S., and KORNOWSKI, R. (2006). Potential hazards and technical considerations associated with myocardial cell transplantation protocols for ischemic myocardial syndrome. *J Am Coll Cardiol* **48**, 1519-1526.
- BERRY, C., MURDOCH, D.R., and MCMURRAY, J.J. (2001). Economics of chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* **3**, 283-291.
- BISCHOFF, R., and HEINTZ, C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* **201**, 41-54.
- BORENSTEIN, N., CHETBOUL, V., RAJNOCH, C., BRUNEVAL, P., and CARPENTIER, A. (2002). Successful cellular cardiomyoplasty in canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* **74**, 298-299.
- BOTTINO, R., LEMARCHAND, P., TRUCCO, M., and GIANNOUKAKIS, N. (2003). Gene- and cell-based therapeutics for type I diabetes mellitus. *Gene Ther* **10**, 875-889.
- CAIOZZO, V.J., and HADDAD, F. (1996). Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev* **24**, 321-361.
- CATON, D., CALABRESE, A., MAS, C., SERRE-BEINIER, V., CHAROLLAIS, A., CAILLE, D., ZUFFEREY, R., TRONO, D., and MEDA, P. (2003). Lentivirus-mediated transduction of connexin cDNAs shows level- and isoform-specific alterations in insulin secretion of primary pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* **116**, 2285-2294.
- CHACHQUES, J.C., CATTADORI, B., HERREROS, J., PROSPER, F., TRAININI, J.C., BLANCHARD, D., FABIANI, J.N., and CARPENTIER, A. (2002). Treatment of heart failure with autologous skeletal myoblasts. *Herz* **27**, 570-578.
- CHACHQUES, J.C., HERREROS, J., TRAININI, J., JUFFE, A., RENDAL, E., PROSPER, F., and GENOVESE, J. (2004). Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* **95 Suppl 1**, S29-33.

- CHEDRAWY, E.G., WANG, J.S., NGUYEN, D.M., SHUM-TIM, D., and CHIU, R.C. (2002). Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements. *J Thorac Cardiovasc Surg* **124**, 584-590.
- CHEEMA, U., BROWN, R., MUDERA, V., YANG, S.Y., MCGROUTHER, G., and GOLDSPIK, G. (2005). Mechanical signals and IGF-I gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle. *J Cell Physiol* **202**, 67-75.
- CHEN, M., FAN, Z.C., LIU, X.J., DENG, J.L., ZHANG, L., RAO, L., YANG, Q., and HUANG, D.J. (2006). Effects of autologous stem cell transplantation on ventricular electrophysiology in doxorubicin-induced heart failure. *Cell Biol Int* **30**, 576-582.
- CHIU, R.C. (1999). Cardiac cell transplantation: the autologous skeletal myoblast implantation for myocardial regeneration. *Advances in Cardiac Surgery* **11**, 69-98.
- CHIU, R.C., ZIBAITIS, A., and KAO, R.L. (1995). Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* **60**, 12-18.
- DAVANI, S., DESCHASEAUX, F., CHALMERS, D., TIBERGHIE, P., and KANTELEP, J.P. (2005). Can stem cells mend a broken heart? *Cardiovasc Res* **65**, 305-316.
- DEGLURKAR, I., MAL, N., MILLS, W.R., POPOVIC, Z.B., MCCARTHY, P., BLACKSTONE, E.H., LAURITA, K.R., and PENN, M.S. (2006). Mechanical and Electrical Effects of Cell-Based Gene Therapy for Ischemic Cardiomyopathy Are Independent. *Hum Gene Ther*.
- DELAHAYE, F., DE GEVIGNEY, G., GAILLARD, S., and CHENEAU, E. (1998). [Epidemiology and economic impact of heart failure in France]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **91**, 1307-1314.
- DIB, N., MICHLER, R.E., PAGANI, F.D., WRIGHT, S., KEREIAKES, D.J., LENGERICH, R., BINKLEY, P., BUCHELE, D., ANAND, I., SWINGEN, C., DI CARLI, M.F., THOMAS, J.D., JABER, W.A., OPIE, S.R., CAMPBELL, A., MCCARTHY, P., YEAGER, M., DILSIZIAN, V., GRIFFITH, B.P., KORN, R., KREUGER, S.K., GHAZOUL, M., MACLELLAN, W.R., FONAROW, G., EISEN, H.J., DINSMORE, J., and DIETRICH, E. (2005). Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* **112**, 1748-1755.
- DIMMELER, S., ZEIHNER, A.M., and SCHNEIDER, M.D. (2005). Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* **115**, 572-583.
- DOWELL, J.D., RUBART, M., PASUMARTHI, K.B., SOONPAA, M.H., and FIELD, L.J. (2003). Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res* **58**, 336-350.
- FERNANDES, S., AMIRALTA, J.C., LANDE, G., NGUYEN, J.M., FOREST, V., BIGNOLAIS, O., LAMIRALTA, G., HEUDES, D., ORSONNEAU, J.L., HEYMANN, M.F., CHARPENTIER, F., and LEMARCHAND, P. (2006). Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* **69**, 348-358.

- FOUTS, K., FERNANDES, B., MAL, N., LIU, J., and LAURITA, K.R. (2006). Electrophysiological consequence of skeletal myoblast transplantation in normal and infarcted canine myocardium. *Heart Rhythm* **3**, 452-461.
- FRIMM CDE, C., SUN, Y., and WEBER, K.T. (1996). Wound healing following myocardial infarction in the rat: role for bradykinin and prostaglandins. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1279-1285.
- GARREY, W. (1914). The nature of fibrillatory contraction of the heart: its relation to tissue mass and form. *Am J Physiol* **33**, 397-314.
- GHOSTINE, S., CARRION, C., SOUZA, L.C., RICHARD, P., BRUNEVAL, P., VILQUIN, J.T., POUZET, B., SCHWARTZ, K., MENASCHE, P., and HAGEGE, A.A. (2002). Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* **106**, 1131-136.
- GUARITA-SOUZA, L.C., CARVALHO, K.A., REBELATTO, C., SENEGAGLIA, A., HANSEN, P., FURUTA, M., MIYAGUE, N., FRANCISCO, J.C., OLANDOSKI, M., FARIA-NETO, J.R., OLIVEIRA, S.A., and BROFMAN, P.R. (2006). Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol* **111**, 423-429.
- GUTSTEIN, D.E., DANIK, S.B., SEREYSKY, J.B., MORLEY, G.E., and FISHMAN, G.I. (2003). Subdiaphragmatic murine electrophysiological studies: sequential determination of ventricular refractoriness and arrhythmia induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1091-1096.
- GUTSTEIN, D.E., MORLEY, G.E., VAIDYA, D., LIU, F., CHEN, F.L., STUHLMANN, H., and FISHMAN, G.I. (2001). Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction. *Circulation* **104**, 1194-1199.
- HAGEGE, A.A., MAROLLEAU, J.P., VILQUIN, J.T., ALHERITIERE, A., PEYRARD, S., DUBOC, D., ABERGEL, E., MESSAS, E., MOUSSEAU, E., SCHWARTZ, K., DESNOS, M., and MENASCHE, P. (2006). Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* **114**, 1108-113.
- HODGSON, D.M., BEHFAR, A., ZINGMAN, L.V., KANE, G.C., PEREZ-TERZIC, C., ALEKSEEV, A.E., PUCEAT, M., and TERZIC, A. (2004). Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H471-479.
- HU, P., YIN, C., ZHANG, K.M., WRIGHT, L.D., NIXON, T.E., WECHSLER, A.S., SPRATT, J.A., and BRIGGS, F.N. (1995). Transcriptional regulation of phospholamban gene and translational regulation of SERCA2 gene produces coordinate expression of these two sarcoplasmic reticulum proteins during skeletal muscle phenotype switching. *J Biol Chem* **270**, 11619-11622.
- HUTCHESON, K.A., ATKINS, B.Z., HUEMAN, M.T., HOPKINS, M.B., GLOWER, D.D., and TAYLOR, D.A. (2000). Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* **9**, 359-368.
- JAIN, M., DERSIMONIAN, H., BRENNER, D.A., NGOY, S., TELLER, P., EDGE, A.S., ZAWADZKA, A., WETZEL, K., SAWYER, D.B., COLUCCI, W.S., APSTEIN, C.S., and LIAO, R. (2001). Cell therapy attenuates deleterious

- ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* **103**, 1920-1927.
- JANSE, M.J., OPTHOF, T., and KLEBER, A.G. (1998). Animal models of cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res* **39**, 165-177.
- KAJSTURA, J., ROTA, M., WHANG, B., CASCAPERA, S., HOSODA, T., BEARZI, C., NURZYNSKA, D., KASAHARA, H., ZIAS, E., BONAFE, M., NADALGINARD, B., TORELLA, D., NASCIMBENE, A., QUAINI, F., URBANEK, K., LERI, A., and ANVERSA, P. (2005). Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* **96**, 127-137.
- KOH, G.Y., KLUG, M.G., SOONPAA, M.H., and FIELD, L.J. (1993). Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* **92**, 1548-1554.
- KOH, G.Y., SOONPAA, M.H., KLUG, M.G., PRIDE, H.P., COOPER, B.J., ZIPES, D.P., and FIELD, L.J. (1995). Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J Clin Invest* **96**, 2034-2042.
- KOLETTIS, T.M. (2006). Arrhythmogenesis after cell transplantation post-myocardial infarction. Four burning questions-And some answers. *Cardiovasc Res* **69**, 299-301.
- LEBERER, E., HARTNER, K.T., BRANDL, C.J., FUJII, J., TADA, M., MACLENNAN, D.H., and PETTE, D. (1989). Slow/cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban mRNAs are expressed in chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Eur J Biochem* **185**, 51-54.
- LEOBON, B., GARCIN, I., MENASCHE, P., VILQUIN, J.T., AUDINAT, E., and CHARPAK, S. (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7808-7811.
- LEOR, J., PATTERSON, M., QUINONES, M.J., KEDES, L.H., and KLONER, R.A. (1996). Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* **94**, 11332-336.
- LIVAK, K.J., and SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- LUCAS, C.A., KANG, L.H., and HOH, J.F. (2000). Monospecific antibodies against the three mammalian fast limb myosin heavy chains. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 303-308.
- MAKINO, S., FUKUDA, K., MIYOSHI, S., KONISHI, F., KODAMA, H., PAN, J., SANO, M., TAKAHASHI, T., HORI, S., ABE, H., HATA, J., UMEZAWA, A., and OGAWA, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103**, 697-705.
- MAKKAR, R.R., LILL, M., and CHEN, P.S. (2003). Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol* **42**, 2070-2072.
- MARELLI, D., DESROSIERS, C., EL-ALFY, M., KAO, R.L., and CHIU, R.C. (1992). Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* **1**, 383-390.

- MAUREL, A., AZARNOUSH, K., SABBAH, L., VIGNIER, N., LE LORC'H, M., MANDET, C., BISSERY, A., GARCIN, I., CARRION, C., FISZMAN, M., BRUNEVAl, P., HAGEGE, A., CARPENTIER, A., VILQUIN, J.T., and MENASCHE, P. (2005). Can cold or heat shock improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium? *Transplantation* **80**, 660-665.
- MAURO, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493-495.
- MENASCHE, P. (2003). Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res* **58**, 351-357.
- MENASCHE, P., HAGEGE, A.A., SCORSIN, M., POUZET, B., DESNOS, M., DUBOC, D., SCHWARTZ, K., VILQUIN, J.T., and MAROLLEAU, J.P. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* **357**, 279-280.
- MENASCHE, P., HAGEGE, A.A., VILQUIN, J.T., DESNOS, M., ABERGEL, E., POUZET, B., BEL, A., SARATEANU, S., SCORSIN, M., SCHWARTZ, K., BRUNEVAl, P., BENBUNAN, M., MAROLLEAU, J.P., and DUBOC, D. (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **41**, 1078-1083.
- MILLS, W.R., MAL, N., KIEDROWSKI, M.J., UNGER, R., FORUDI, F., POPOVIC, Z.B., PENN, M.S., and LAURITA, K.R. (2006). Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*.
- MORGAN, J.E., and PARTRIDGE, T.A. (2003). Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1151-1156.
- MOSS, A.J., DAUBERT, J., and ZAREBA, W. (2002). MADIT-II: clinical implications. *Card Electrophysiol Rev* **6**, 463-465.
- MURRY, C.E., KAY, M.A., BARTOSEK, T., HAUSCHKA, S.D., and SCHWARTZ, S.M. (1996a). Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* **98**, 2209-2217.
- MURRY, C.E., SOONPAA, M.H., REINECKE, H., NAKAJIMA, H., NAKAJIMA, H.O., RUBART, M., PASUMARTHI, K.B., VIRAG, J.I., BARTELMEZ, S.H., POPPA, V., BRADFORD, G., DOWELL, J.D., WILLIAMS, D.A., and FIELD, L.J. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* **428**, 664-668.
- MURRY, C.E., WISEMAN, R.W., SCHWARTZ, S.M., and HAUSCHKA, S.D. (1996b). Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* **98**, 2512-2523.
- NEGRONI, E., BUTLER-BROWNE, G.S., and MOULY, V. (2006). Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol Biol (Paris)* **54**, 100-108.
- NERBONNE, J.M. (2004). Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med* **14**, 83-93.
- 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., and ANVERSA, P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.
- OTT, H.C., BERJUKOW, S., MARKSTEINER, R., MARGREITER, E., BOCK, G., LAUFER, G., and HERING, S. (2004a). On the fate of skeletal myoblasts in a

- cardiac environment: down-regulation of voltage-gated ion channels. *J Physiol* **558**, 793-805.
- OTT, H.C., BONAROS, N., MARKSTEINER, R., WOLF, D., MARGREITER, E., SCHACHNER, T., LAUFER, G., and HERING, S. (2004b). Combined transplantation of skeletal myoblasts and bone marrow stem cells for myocardial repair in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* **25**, 627-634.
- PAGANI, F.D., DERSIMONIAN, H., ZAWADZKA, A., WETZEL, K., EDGE, A.S., JACOBY, D.B., DINSMORE, J.H., WRIGHT, S., ARETZ, T.H., EISEN, H.J., and AARONSON, K.D. (2003). Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* **41**, 879-888.
- PFEFFER, J.M., PFEFFER, M.A., FLETCHER, P.J., and BRAUNWALD, E. (1991). Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* **260**, H1406-1414.
- PFEFFER, M.A., and BRAUNWALD, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161-1172.
- PITARD, B., BELLO-ROUFAI, M., LAMBERT, O., RICHARD, P., DESIGAUX, L., FERNANDES, S., LANCTIN, C., POLLARD, H., ZEGHAL, M., RESCAN, P.Y., and ESCANDE, D. (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res* **32**, e159.
- PITARD, B., POLLARD, H., AGBULUT, O., LAMBERT, O., VILQUIN, J.T., CHEREL, Y., ABADIE, J., SAMUEL, J.L., RIGAUD, J.L., MENORET, S., ANEGON, I., and ESCANDE, D. (2002). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther* **13**, 1767-1775.
- PLANAT-BENARD, V., MENARD, C., ANDRE, M., PUCEAT, M., PEREZ, A., GARCIA-VERDUGO, J.M., PENICAUD, L., and CASTEILLA, L. (2004). Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* **94**, 223-229.
- POUZET, B., GHOSTINE, S., VILQUIN, J.-T., GARCIN, I., SCORSIN, M., HAGÈGE, A.A., DUBOC, D., SCHWARTZ, K., and MENASCHE, P. (2001a). Is Skeletal Myoblast Transplantation Clinically Relevant in the Era of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors? *Circulation* **104**, I223-I228.
- POUZET, B., VILQUIN, J.T., HAGEGE, A.A., SCORSIN, M., MESSAS, E., FISZMAN, M., SCHWARTZ, K., and MENASCHE, P. (2001b). Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. *Annals of Thoracic Surgery* **71**, 844-850; discussion 850-841.
- REINECKE, H., MINAMI, E., VIRAG, J.I., and MURRY, C.E. (2004). Gene transfer of connexin43 into skeletal muscle. *Hum Gene Ther* **15**, 627-636.
- REINECKE, H., POPPA, V., and MURRY, C.E. (2002). Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 241-249.
- REINECKE, H., ZHANG, M., BARTOSEK, T., and MURRY, C.E. (1999). Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* **100**, 193-202.

- ROBINSON, S.W., CHO, P.W., LEVITSKY, H.I., OLSON, J.L., HRUBAN, R.H., ACKER, M.A., and KESSLER, P.D. (1996). Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell Transplant* **5**, 77-91.
- ROSE, E.A., GELIJNS, A.C., MOSKOWITZ, A.J., HEITJAN, D.F., STEVENSON, L.W., DEMBITSKY, W., LONG, J.W., ASCHEIM, D.D., TIERNEY, A.R., LEVITAN, R.G., WATSON, J.T., MEIER, P., RONAN, N.S., SHAPIRO, P.A., LAZAR, R.M., MILLER, L.W., GUPTA, L., FRAZIER, O.H., DESVIGNE-NICKENS, P., OZ, M.C., and POIRIER, V.L. (2001). Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *N Engl J Med* **345**, 1435-1443.
- ROYER, A., DEMOLOMBE, S., EL HARCHI, A., LE QUANG, K., PIRON, J., TOUMANIANTZ, G., MAZURAS, D., BELLOCQ, C., LANDE, G., TERRENOIRE, C., MOTOIKE, H.K., CHEVALLIER, J.C., LOUSSOUARN, G., CLANCY, C.E., ESCANDE, D., and CHARPENTIER, F. (2005). Expression of human ERG K⁺ channels in the mouse heart exerts anti-arrhythmic activity. *Cardiovasc Res* **65**, 128-137.
- RUBART, M., PASUMARTHI, K.B., NAKAJIMA, H., SOONPAA, M.H., NAKAJIMA, H.O., and FIELD, L.J. (2003). Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res* **92**, 1217-1224.
- SCHIAFFINO, S., and REGGIANI, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* **77**, 493-501.
- SCHIAFFINO, S., and REGGIANI, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* **76**, 371-423.
- SCORSIN, M., HAGEGE, A., VILQUIN, J.T., FISZMAN, M., MAROTTE, F., SAMUEL, J.L., RAPPAPORT, L., SCHWARTZ, K., and MENASCHE, P. (2000). Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* **119**, 1169-1175.
- SCORSIN, M., MAROTTE, F., SABRI, A., LE DREF, O., DEMIRAG, M., SAMUEL, J.L., RAPPAPORT, L., and MENASCHE, P. (1996). Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation* **94**, 11337-340.
- SEVERS, N.J., ROTHERY, S., DUPONT, E., COPPEN, S.R., YEH, H.I., KO, Y.S., MATSUSHITA, T., KABA, R., and HALLIDAY, D. (2001). Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech* **52**, 301-322.
- SIMINIAK, T., KALAWSKI, R., FISZER, D., JERZYKOWSKA, O., RZEZNICZAK, J., ROZWADOWSKA, N., and KURPISZ, M. (2004). Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* **148**, 531-537.
- SKUK, D., ROY, B., GOULET, M., CHAPDELAIN, P., BOUCHARD, J.P., ROY, R., DUGRE, F.J., LACHANCE, J.G., DESCHENES, L., HELENE, S., SYLVAIN, M., and TREMBLAY, J.P. (2004). Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Ther* **9**, 475-482.

- SMITS, P.C. (2004). Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts: a review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiol* **52**, 525-535.
- SMITS, P.C., VAN GEUNS, R.J., POLDERMANS, D., BOUNTIOUKOS, M., ONDERWATER, E.E., LEE, C.H., MAAT, A.P., and SERRUYS, P.W. (2003). Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* **42**, 2063-2069.
- SOLIMAN, A., KRUCOFF, M., CRATER, S., MORIMOTO, Y., and TAYLOR, D. (2004). Cell location may be a primary determinant of safety after myoblast transplantation into the infarcted heart. *J Am Coll Cardiol* **43**, 15A (abstract).
- SOLIMAN, A.M., TAYLOR, D.A., THOMPSON, R.B., MORIMOTO, Y., MCMICHAEL, M., CRATER, S., and KRUCOFF, M.W. (2003). Assessment of electrical instability after autologous myoblast transplantation in a rabbit infarct model. *Circulation* **108(Suppl IV)**, 547-548 (abstract).
- SOONPAA, M.H., KOH, G.Y., KLUG, M.G., and FIELD, L.J. (1994). Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* **264**, 98-101.
- SUZUKI, K., BRAND, N.J., ALLEN, S., KHAN, M.A., FARRELL, A.O., MURTUZA, B., OAKLEY, R.E., and YACOUB, M.H. (2001). Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* **122**, 759-766.
- THEIS, M., MAGIN, T.M., PLUM, A., and WILLECKE, K. (2000). General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse. *Methods* **20**, 205-218.
- THOMPSON, R.B., EMANI, S.M., DAVIS, B.H., VAN DEN BOS, E.J., MORIMOTO, Y., CRAIG, D., GLOWER, D., and TAYLOR, D.A. (2003). Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* **108 Suppl 1**, II264-271.
- VAN DEN BOS, E.J., DAVIS, B.H., and TAYLOR, D.A. (2004). Transplantation of skeletal myoblasts for cardiac repair. *J Heart Lung Transplant* **23**, 1217-1227.
- VAN DEN BOS, E.J., and TAYLOR, D.A. (2003). Cardiac transplantation of skeletal myoblasts for heart failure. *Minerva Cardioangiol* **51**, 227-243.
- VAN RIJEN, H.V., ECKARDT, D., DEGEN, J., THEIS, M., OTT, T., WILLECKE, K., JONGSMA, H.J., OPTHOF, T., and DE BAKKER, J.M. (2004). Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* **109**, 1048-1055.
- WALKER, M.J., CURTIS, M.J., HEARSE, D.J., CAMPBELL, R.W., JANSE, M.J., YELLON, D.M., COBBE, S.M., COKER, S.J., HARNESS, J.B., HARRON, D.W., and ET AL. (1988). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* **22**, 447-455.
- YA, J., ERDTSIECK-ERNSTE, E.B., DE BOER, P.A., VAN KEMPEN, M.J., JONGSMA, H., GROS, D., MOORMAN, A.F., and LAMERS, W.H. (1998). Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res* **82**, 360-366.
- ZAMMIT, P., and BEAUCHAMP, J. (2001). The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* **68**, 193-204.

ZIBAITIS, A., GREENTREE, D., MA, F., MARELLI, D., DUONG, M., and CHIU, R.C. (1994). Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Transplant Proc* **26**, 3294.

ANNEXE

TITRE :

Thérapie cellulaire cardiaque : instabilité électrique du myocarde après greffe de myoblastes autologues

RESUME : Les premiers essais cliniques de thérapie cellulaire cardiaque, ont suggéré la faisabilité et l'efficacité de l'injection intramyocardique de myoblastes, mais également la survenue d'arythmies au décours de l'injection.

Dans un modèle de rongeur, nous avons montré que l'injection intramyocardique de myoblastes autologues facilitait le déclenchement de tachycardies ventriculaires alors que l'injection de véhicule ou de cellules dérivées de la moelle ne modifiait pas la stabilité électrique du myocarde. Les myoblastes transplantés avaient une activité contractile indépendante de celle des cardiomyocytes hôtes. Cependant, la surexpression de connexine43 (protéine principale des jonctions communicantes des cardiomyocytes) dans les myoblastes permet aux 2 types cellulaires se contracter de façon synchrone.

Ce travail suggère l'importance du couplage électromécanique intercellulaire dans l'innocuité et l'efficacité de la thérapie cellulaire cardiaque.

MOTS-CLES :

Thérapie cellulaire, insuffisance cardiaque, myoblaste, arythmie, électrophysiologie cardiaque.

TITLE :

Myoblast therapy for myocardial repair and arrhythmic risk

ABSTRACT :

Small scale clinical trials suggested the feasibility and the efficacy of myoblast transplantation. However, these trials were hampered by unexpected episodes of arrhythmia.

Using a rat model we showed that myoblast transplantation can facilitate ventricular tachycardia occurrence whereas vehicle or bone marrow cells injection did not alter cardiac electrical stability. We also showed that transplanted myoblasts contract without synchrony with host cardiomyocytes. However, following connexin43 overexpression (the main gap junction protein in cardiomyocytes) in myoblasts, both cell types can contract in synchrony.

This work suggests the importance of electromechanical cell coupling for the safety and the efficacy in cardiac cell therapy.

KEY WORDS :

Cell therapy, heart failure, myoblast, arrhythmia, cardiac electrophysiology.

Sarah FERNANDES

74 av du bac

94210 La Varenne St Hilaire