

N002

### CONTRÔLE EX VIVO DU PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION DES PROGÉNITEURS CARDIAQUES EN CARDIOMYOCYTES PAR LES MYOCYTES ET LES FIBROBLASTES CARDIAQUES HUMAINS MATURES

V. LAMBERT<sup>1</sup>, E. GOUADON<sup>1</sup>, B. BRINON<sup>2</sup>, N. RAYMOND<sup>1</sup>, P. MAUD<sup>3</sup>, S. DEMOLOMBE<sup>3</sup>, J.-F. RENAUD<sup>1</sup>, M. PUCEAT<sup>2</sup>, C. RUCKER-MARTIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS-UMR8162, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France

<sup>2</sup> Inserm-UMR861, I-STEM, Evry, France

<sup>3</sup> Institut Du Thorax, Inserm-UMR915/CNRS-ELR3147, Nantes, France

But : La thérapie cellulaire constitue un réel espoir dans la prévention et le traitement de la dysfonction cardiaque. Nous avons développé un modèle ex vivo permettant d'étudier le rôle des cardiomyocytes et des fibroblastes humains adultes sur le devenir des progéniteurs cardiaques.

Rappels : Les cardiomyocytes maintenus en culture en absence de fibroblastes se « dédifférencient » puis se « redifférencient ». Ce processus de redifférenciation est inhibé en présence des fibroblastes.

**Méthodes-Résultats** – Des cellules souches embryonnaires de primates ORMES-2 ont été génétiquement modifiées pour exprimer la GFP sous contrôle transcriptionnel du promoteur de l'actine- $\alpha$ -cardiaque et sélectionnées sur leur capacité à exprimer SSEA-1 après traitement au BMP2. Les progéniteurs cardiaques sélectionnés ont été ensemencés sur des cultures de 4 semaines de cardiomyocytes, de fibroblastes cardiaques ou de cardiomyocytes/fibroblastes humains et maintenus en culture 4 semaines supplémentaires. Après 2 semaines, la présence de cellules GFP positives dans les trois types de culture indique que les progéniteurs cardiaques ont bénéficié de l'environnement paracrine des différentes cellules pour poursuivre leur différenciation. Après 4 semaines, les progéniteurs cardiaques sont alignés et présentent un aspect allongé lorsqu'ils sont sur des cardiomyocytes/fibroblastes ou des fibroblastes suggérant un contrôle de leur forme par les fibroblastes. La présence de cardiomyocytes permet aux progéniteurs de développer un appareil sarcomérique strié aux lignes Z régulièrement espacées de 2  $\mu$ m. Ces progéniteurs bien sarcomérisés et alignés expriment la connexine-43 à leur membrane. Cette Cx43 membranaire est phosphorylée contrairement à la Cx43 cytosolique qui est déphosphorylée. A la membrane, la cadherine est associée à la Cx43 indiquant la mise en place de plusieurs acteurs des complexes jonctionnels entre les progéniteurs cardiaques et les cellules hôtes.

**Conclusion** – Si les cardiomyocytes sont nécessaires à la maturation de l'appareil sarcomérique des progéniteurs cardiaques, les fibroblastes semblent contrôler leur forme et leur capacité à constituer des complexes jonctionnels. Ainsi, à la différence de ce qui est observé pour les cardiomyocytes matures maintenus en culture, la maturation structurale et fonctionnelle des cellules progénitrices cardiaques est dépendante de la présence conjointe de myocytes et de fibroblastes cardiaques.

N003

### CARACTÉRISATION ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DE PROGÉNITEURS CARDIAQUES ISSUS DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES

E. GOUADON<sup>1</sup>, V. LAMBERT<sup>1</sup>, B. BRINON<sup>3</sup>, P. NAUD<sup>4</sup>, S. DEMOLOMBE<sup>4</sup>, N. RAYMOND<sup>1</sup>, E. BELLI<sup>2</sup>, M. PUCEAT<sup>3</sup>, C. RUCKER-MARTIN<sup>1</sup>, J.-F. RENAUD DE LA FAVERIE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 8162, Université Paris Sud, Le Plessis Robinson, France

<sup>2</sup> Cardiologie Congénitale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France

<sup>3</sup> Inserm UMR 861 Université d'Evry, Evry, France

<sup>4</sup> Institut du Thorax, Inserm UMR 915, CNRS ERL3147, Université de Nantes, Nantes, France

Les progéniteurs cardiaques issus de cellules souches embryonnaires humaines apparaissent comme de bons candidats dans la prévention et le traitement de la dysfonction cardiaque par thérapie cellulaire. Cependant, la greffe de cellules présentant des propriétés électriques indésirables pourrait prédisposer les patients à des arythmies. Il est donc important de caractériser les propriétés électrophysiologiques des progéniteurs cardiaques avant transplantation. Les cellules progénitrices cardiaques utilisées sont dérivées de la lignée HUES-24 et sélectionnées sur leur capacité à exprimer SSEA-1 après une induction de 4 jours par le BMP2. A l'aide de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière, nous avons pu enregistrer des courants Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>, 24 à 48 h après la sélection. Les courants Ca<sup>2+</sup> observés ( $2,22 \pm 0,30$  Pa/pF) sont de type L, aucun courant de type T n'ayant été détecté dans ces conditions. Ces courants sont insensibles à l'isoproterenol (1  $\mu$ m) et à la forskoline (30  $\mu$ m) suggérant l'absence de régulation  $\beta$ -adrénergique. Des courants K<sup>+</sup> activés par dépolarisation ( $6,79 \pm 1,10$  Pa/pF) sensibles au tétraéthylammonium (10 mM) et à la 4-aminopyridine (5 mM) ont été caractérisés. Ces courants rectifiants sortants ressemblent aux courants rectifiants sortants retardés (IKDR) déjà décrits sur des cellules souches embryonnaires murines. En revanche, aucun courant entrant activé par hyperpolarisation n'a été observé. Finalement, aucune conductance Na<sup>+</sup> n'a pu être mise en évidence. Sur les cellules n'exprimant pas SSEA-1, utilisées comme contrôles négatifs, aucun courant Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> n'a été détecté. Le profil moléculaire des canaux ioniques exprimés par les cellules progénitrices est abordé parallèlement par une approche génomique à l'aide de la RT-PCR haut débit.

En conclusion, les cellules souches embryonnaires humaines présentent les courants majeurs impliqués dans l'électrogenèse cardiaque dès 24 h après leur orientation cardiaque. Néanmoins, l'absence de régulation  $\beta$ -adrénergique et de courants Na<sup>+</sup> souligne l'immatunité de ces cellules comparées aux cardiomyocytes matures. Le suivi de la genèse des propriétés électrophysiologiques de ces progéniteurs cardiaques, dans le contexte d'une thérapie cellulaire cardiovasculaire, devrait nous permettre d'explorer la capacité de ces cellules à exprimer un phénotype électrophysiologique mature et à établir des couplages excitation-contraction avec les cellules hôtes.