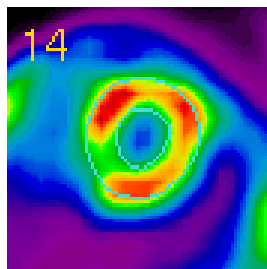
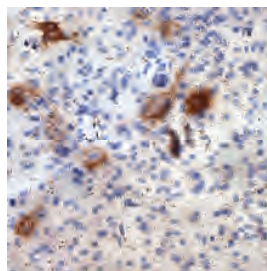
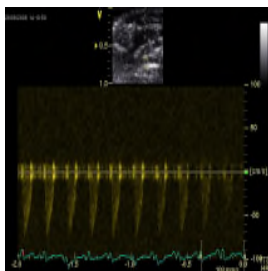


Université
de Liège



Faculté de Médecine
Département des Sciences Cliniques
Hématologie Biologique
GIGA-Research

Thérapie cellulaire de réparation tissulaire cardiaque par cellules souches circulantes



Thèse présentée par
Marie Delgaudine
En vue de l'obtention du grade de
**Docteur en Sciences
Biomédicales et
Pharmaceutiques**

Promoteur : Prof. Yves Beguin

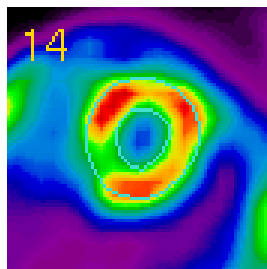
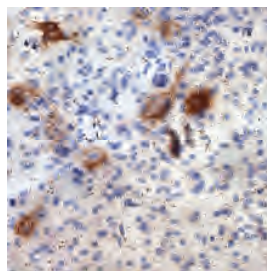
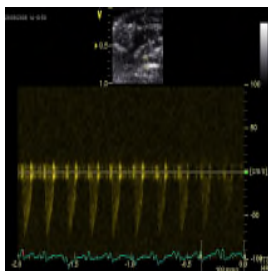
Année académique : 2009-2010

Université
de Liège



Faculté de Médecine
Département des Sciences Cliniques
Hématologie Biologique
GIGA-Research

Thérapie cellulaire de réparation tissulaire cardiaque par cellules souches circulantes



Thèse présentée par
Marie Delgaudine
En vue de l'obtention du grade de
**Docteur en Sciences
Biomédicales et
Pharmaceutiques**

Promoteur : Prof. Yves Beguin

Année académique : 2009-2010

Au terme de ce travail, je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Yves Beguin pour son accueil au sein du service d'Hématologie, sa disponibilité pour relire et corriger mes travaux dont ce manuscrit, et de m'avoir permis de mener à bien ma thèse de doctorat.

Je remercie ensuite le Docteur André Gothot du temps qu'il m'a consacré tout au long de ce travail et pour ses conseils avisés aussi, bien dans la pratique qu'en théorie.

Je voudrais également remercier le Professeur Pierard pour sa participation à ce projet et pour l'intérêt qu'il a porté à celui-ci.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Lancellotti et au docteur Lambermont pour leurs implications dans les expérimentations animales et leurs nombreuses explications sur la physiopathologie de l'ischémie myocardique. Je remercie également le Docteur Roelants de m'avoir permis d'étudier la perfusion du muscle cardiaque dans notre modèle murin.

Je tiens ensuite à exprimer une reconnaissance particulière aux quelques personnes que j'ai rencontrées au cours de ce travail dont le Docteur Pierre Drion et Jean-Pol Cheramibien qui m'ont apporté leur aide pour la mise au point de la technique chirurgicale nécessaire à l'élaboration de ce travail ; Charles Lambert et Pierre Mineur qui ont élargi les perspectives des recherches à appliquer à notre modèle animal.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres du laboratoire pour ces années passées à travailler en collaboration et dans la bonne humeur : Sophie, pour son travail rigoureux, la confiance totale qu'on peut lui accorder, sa douceur avec les souris et son aide précieuse pour finaliser les dernières manipulations ; Alexandra, pour son amitié et sa grande disponibilité à mon égard ; Jacques, pour avoir été un modèle par la rigueur de son travail et pour toujours avoir été prêt à nous aider et à nous donner de précieux conseils ainsi que pour les bons moments que nous avons partagés ; France et Stéphanie, pour notre vision partagée du travail.

Maman, je te remercie d'être toujours là pour moi, de me soutenir et de la confiance que tu m'as toujours témoignée au cours de mes études et de ma vie.

Arnaud, je te remercie pour ton soutien, ton écoute, ta patience, d'avoir été à mes côtés tout au long de ce doctorat, ainsi que de m'avoir encouragée à le finaliser.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien du Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS). Je remercie cet Organisme ainsi que les personnes qui m'ont aidée à récolter ces financements.

Je voudrais enfin remercier les Professeurs Defraigne, Kolh et Gianello, ainsi que le docteur Norol qui me font l'immense honneur de faire partie de mon jury.

Abréviations

AC	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messagé
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPC	cellule progénitrice cardiaque
CPH	cellule progénitrice hématopoïétique
CPM	cellule progénitrice mésenchymateuse
CS	cellule souche
CSE	cellule souche embryonnaire
CSH	cellule souche hématopoïétique
CSM	cellule souche mésenchymateuse
CSN	cellule souche neurale
CD	cluster designation
CFU-EC	<i>endothelial cell colony-forming units</i>
CFU-F	<i>colony-forming units-fibroblasts</i>
CFUF-IC	<i>colony forming units fibroblast-initiating cells</i>
CFU-GM	<i>colony-forming units granulocyte-macrophage</i>
Cx	connexine
Cy	cyclophosphamide
DC	débit cardiaque
DIVGd	dimensions internes du VG en fin de diastole
DIVGs	dimensions internes du VG en fin de systole
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMEM-LG	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium - low glucose</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
EBM-2	<i>Endothelium Basal Medium 2</i>
ECFC	<i>endothelial colony forming cells</i>
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
Ees	élastance
Epo	érythropoïétine
EPVG	épaisseur de la paroi postérieure du VG
ESIs	épaisseur du septum interventriculaire en systole
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , sérum foetal bovin
FC	fréquence cardiaque
FCS	<i>fetal calf serum</i> , sérum foetal de boeuf
FEVG	fraction d'éjection du ventricule gauche
FR	fraction de raccourcissement
GB	globule blanc
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating facor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GVHD	<i>graft versus host desease</i>
Hst	hoechst
IAM	infarctus aigu du myocarde
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine

IC	infarctus cardiaque
IGF-1	<i>insulin growth factor-1</i>
IL	interleukine
IM	infarctus du myocarde
IP	iodure de propidium
i.p.	par voie intrapéritonéale
i.v.	par voie intraveineuse
Jak2	Janus kinase-2
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
IFN- γ	interféron γ
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	lipopolysaccharides
MAPC	<i>multipotent adult progenitor cells</i>
MEF-2	<i>myocyte-specific enhancer factor 2</i>
MMP	métalloprotéinases
MO	moelle osseuse
NO	oxyde nitrique
NS	non significatif
OI	ostéogenèse imparfaite
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	progéniteur endothélial
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecules-1</i>
PFD	pression de fin de diastole
PFS	pression de fin de systole
RMN	résonance magnétique nucléaire
s.c.	par voie sous-cutanée
SCF	stem cells factor
SCID	<i>sever combined immunodeficiency</i>
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SP	sang périphérique
SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i>
STEMI	<i>ST-Segment Elevation Myocardial Infarction</i>
TA	température ambiante
Tc	technétium
TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TPO	thrombopoïétine
TTC	2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride
U	unité
UV	ultra-violet
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
VFD	volume de fin de diastole
VFS	volume de fin de systole
VDVG	volume de fin de diastole du ventricule gauche
VG	ventricule gauche
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
Vp	particule virale
VTP195183	acide rétinoïque
vWF	facteur de van Willebrand

Table des matières

Introduction	1
<u>1. Les cellules souches</u>	1
1.1. Les cellules souches embryonnaires	1
1.2. Les cellules souches somatiques	2
1.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques	2
1.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses	2
1.2.2.1. Différenciation des CSM en cardiomyocytes par de la 5-azacytidine	5
1.3. Plasticité des cellules souches adultes	6
<u>2. Pathologies cardiaques</u>	7
2.1. Le cœur normal	7
2.2. Les cellules progénitrices cardiaques	8
2.3. Maladies ischémiques cardiaques	8
<u>3. La thérapie cellulaire et la réparation tissulaire cardiaque</u>	9
3.1. Voies d'injection des cellules	10
3.2. Origine des cellules utilisables en thérapie cellulaire cardiaque	11
3.2.1. Les péricytes du muscle squelettique	12
3.2.2. Cellules souches embryonnaires	12
3.2.3. Cellules souches hématopoïétiques	13
3.2.4. Précurseurs circulants des cellules endothéliales	14
3.2.5. Cellules souches mésenchymateuses	14
3.3. Effets indésirables de la thérapie cellulaire	15
3.4. Etudes cliniques	16
3.5. La thérapie génique	17
<u>4. Mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse</u>	20
4.1. Les niches de la moelle osseuse	20
4.2. Caractéristiques des cellules souches mobilisées	21
4.3. Facteurs induisant la mobilisation des cellules souches	22
4.4. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) et son récepteur	22
4.5. Avantages de la collecte de cellules souches mobilisées en périphérie	24
4.6. Mécanismes cellulaires et moléculaires	25
<u>5. G-CSF et les infarctus aigus du myocarde</u>	29
5.1. Effets protecteurs directs du G-CSF sur les cardiomyocytes	29
5.2. Régénération myocardique suite à la mobilisation de cellules souches	30
5.3. Modèles animaux et études cliniques	34
<u>6. Technique d'imagerie médicale chez le petit animal</u>	39
6.1. Le cœur murin	39
6.2. L'échocardiographie de la souris	40
6.3. Technique de sonde à conductance : boucle pression-volume	41
6.4. Single photon emission computed tomography (SPECT)	42
Objectifs et plan du travail	43
Matériel et Méthodes	46
<u>1. Espèces murines</u>	46
1.1. Souris C57Bl/6	46
1.2. Souris C57Bl/6-TgN(ACTbEGFP)10sb (GFPtg)	46
<u>2. Préparation des prélèvements de cellules humaines</u>	46
<u>3. Culture cellulaire</u>	47
3.1. Cellules souches mésenchymateuses murines (CSMm)	47
3.2. Cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh)	47
3.3. Cellules souches hématopoïétiques humaines (CSHh)	48
3.4. Congélation des cellules	48
3.5. "Colony-forming units granulocyte-macrophage" (CFU-GM)	48
3.6. "Colony-forming units-fibroblasts" (CFU-F)	49
3.7. "Colony-forming units fibroblast-initiating cells" (CFUF-IC)	49
3.8. Formation de colonies de cellules endothéliales	49
3.8.1. "Endothelial cell colony-forming units" (CFU-EC)	49

3.8.2. “Endothelial colony-forming cells” (ECFC)	50
3.9. Différenciation des CSM en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes	50
3.10. Différenciation des CSM en cardiomyocytes	51
<u>4. Analyse du cycle cellulaire</u>	51
4.1. Hoechst 33342	51
4.2. Iodure de propidium	51
4.3. Draq 5	52
<u>5. Analyse du phénotype des CSM par cytométrie de flux</u>	52
<u>6. Mesure du calcium intracellulaire</u>	53
<u>7. Étude de la contraction dans un gel de collagène</u>	53
<u>8. Identification de facteurs de transcription</u>	53
8.1. Extraction différentielle de protéines	53
8.2. Détection de facteurs de transcription par microarray	54
<u>9. Transduction de CSM par un lentivirus</u>	54
9.1. Production de lentivirus	54
9.2. Transduction des CSM	55
<u>10. Dosage de la troponine T, SDF-1 et G-CSF</u>	55
<u>11. Analyses histologiques, immunohistochimiques et immunofluorescence</u>	56
11.1. Histologie et détermination de la taille de la zone infarctée	56
11.2. Immunohistochimie	56
11.3. Immunofluorescence	57
<u>12. Analyse de la moelle et du sang des souris en cryométrie de flux</u>	57
<u>13. Protocole pour l'étude de la cinétique de mobilisation par du G-CSF chez la souris</u>	58
<u>14. Étude in vivo d'un modèle murin d'infarctus du myocarde</u>	58
14.1. Induction chirurgicale d'un infarctus du myocarde (IM)	58
14.2. Protocoles expérimentaux	58
14.2.1 Evaluation de la contribution du G-CSF à la réparation tissulaire cardiaque	58
14.3. Echocardiographie	60
14.4. Imagerie par microSPECT	61
14.4.1. Acquisition des images	61
14.4.2. Analyses des images SPECT	61
14.5. Sonde à conductance	62
14.5.1. Mesures des boucles pression-volume du VG	62
14.5.2. Acquisition des paramètres hémodynamiques	62
<u>15. Détection de CS dans le sang et la moelle de sujets sains mobilisés</u>	63
15.1. Protocole de mobilisation	63
15.2. Analyse FACS des CSH, CSM et PE	64
<u>16. Analyses statistiques</u>	64
Résultats	65
<i>Résultats Chapitre I : Isolation, caractérisation et différenciation des CSM humaines et murines en vue de leur utilisation en thérapie cellulaire cardiaque. Préparation de greffons de CSM afin d'évaluer leur capacité de régénération tissulaire cardiaque dans un modèle murin.</i>	65
<u>1.1. Objectifs du travail et méthodes</u>	65
<u>1.2. Résultats</u>	66
1.2.1. Isolement et expansion de CSM humaines et murines <i>in vitro</i>	66
1.2.2. Analyse des CSM par cytométrie de flux	67
1.2.3. Evaluation de la fréquence en progéniteurs CFU-F et CFUF-IC	70
1.2.4. Différenciation fonctionnelle des CSM <i>in vitro</i>	72
1.2.5. Analyse du cycle cellulaire des CS	73
1.2.6. Différenciation cardiomyocytaire des CSM amplifiées <i>in vitro</i>	74
1.2.7. Étude de l'expression de la GFP dans les cellules de la moelle de souris transgénique EGFP+	78
<u>1.3. Discussion</u>	80
<i>Résultats Chapitre II : Développement d'un modèle murin d'infarctus du myocarde. Mise au point des techniques immunohistologiques et d'imagerie médicale permettant l'évaluation de l'impact de l'ischémie sur le muscle cardiaque murin.</i>	85
<u>2.1. Objectifs du travail et méthodes</u>	85
<u>2.2. Résultats</u>	86
2.2.1. Modèle murin d'infarctus du myocarde	86
2.2.1.1. Protocole expérimental	86

2.2.1.2. Anatomopathologie	87
2.2.1.3. Survie	88
2.2.2. Analyse immunohistologique de sections de cœurs murins	88
2.2.3. Détermination de la taille de l'infarctus	89
2.2.4. Mise au point des techniques d'imagerie médicale	90
2.2.4.1. Validation de l'analyse par μ SPECT	90
2.2.4.2. Analyses hémodynamiques par échocardiographie	92
2.2.4.3. Evaluation des relations pression-volume par sonde à conductance	93
2.3. Discussion	94

Résultats Chapitre III : Mobilisation des précurseurs hématopoïétiques, mésenchymateux et endothéliaux par du G-CSF et conséquences sur la perfusion et les performances du muscle cardiaque sain. 98

3.1. Objectifs du travail et méthodes 98

3.2. Résultats 99

3.2.1. G-CSF et cellules progénitrices	99
3.2.1.1. Paramètres médullaires et sanguins	99
3.2.1.2. Analyse au Facs des précurseurs mobilisés	100
3.2.1.3. Evaluation du potentiel clonogénique des cellules progénitrices	103
3.2.2. G-CSF et tissu cardiaque sain	103
3.2.2.1. Poids du cœur	103
3.2.2.2. Perfusion cardiaque	104
3.2.2.3. Fonction myocardique	105
3.2.3. Mises au point de la détection des cellules progénitrices et de leurs colonies chez des patients sains	106
3.2.3.1. Cellules mononuclées médullaires et sanguines	106
3.2.3.2. Détection des progéniteurs par cytométrie de flux	107
3.2.3.3. Analyse du potentiel clonogénique des cellules progénitrices (Fig.48)	109
3.2.3.4. Standardisation des tests de formation de colonies à partir des PE dans le SP et dans la MO	111
3.2.3.4.1. "Endothelial cell colony-forming units" (CFU-EC)	111
3.2.3.4.2. "Endothelial colony forming cells" (ECFC)	111
3.2.3.4.3. CFU-EC versus ECFC	112

3.3. Discussion 112

3.3.1. Chez la souris	112
3.3.2. Chez l'homme	118

Résultats Chapitre IV : Mobilisation des précurseurs hématopoïétiques, mésenchymateux et endothéliaux par du G-CSF et conséquences sur la réparation tissulaire cardiaque après infarctus chez la souris. 120

4.1. Objectifs du travail et méthodes 120

4.2. Résultats 121

4.2.1. G-CSF et cellules progénitrices	122
4.2.1.1. Paramètres médullaires et sanguins	122
4.2.1.2. Analyse en FACS des précurseurs mobilisés	122
4.2.1.3. Evaluation du potentiel clonogénique des cellules progénitrices	123
4.2.1.4. Dosages plasmatiques	124
4.2.2. Effets du G-CSF sur la perfusion et la fonction myocardique après infarctus	126
4.2.2.1. Survie	126
4.2.2.2. Poids du cœur	126
4.2.2.3. Histologie et taille de l'infarctus	127
4.2.2.4. Perfusion cardiaque : analyses immunohistochimiques et par μ SPECT	128
4.2.2.5. Fonction myocardique	130
4.2.2.5.1. Echocardiographie	130
4.2.2.5.2. Boucles pression – volume	132
4.2.3. Effets du VEGF sur le muscle cardiaque après IM	133
4.2.3.1. Survie	133
4.2.3.2. Poids du cœur	134
4.2.3.3. Taille de l'infarctus	135

4.3. Discussion 135

Discussion générale et perspectives 145

Bibliographie 154

Annexes

Introduction

Introduction

1. Les cellules souches

Les scientifiques définissent les cellules souches (CS) en se basant sur 3 critères (Fig.1): (1) les CS sont douées de capacités d'auto-renouvellement qui leur permettent de maintenir leur « pool » stable ; (2) une CS peut se différencier en plusieurs types de cellules fonctionnelles matures. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine des cellules sanguines ; les cellules souches neurales (CSN) donnent naissance aux neurones, astrocytes et oligodendrocytes ; les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent se différencier en fibroblastes, ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes ; (3) les cellules souches peuvent repeupler un tissu lésé pour en restaurer la fonction, comme notamment, après une irradiation.

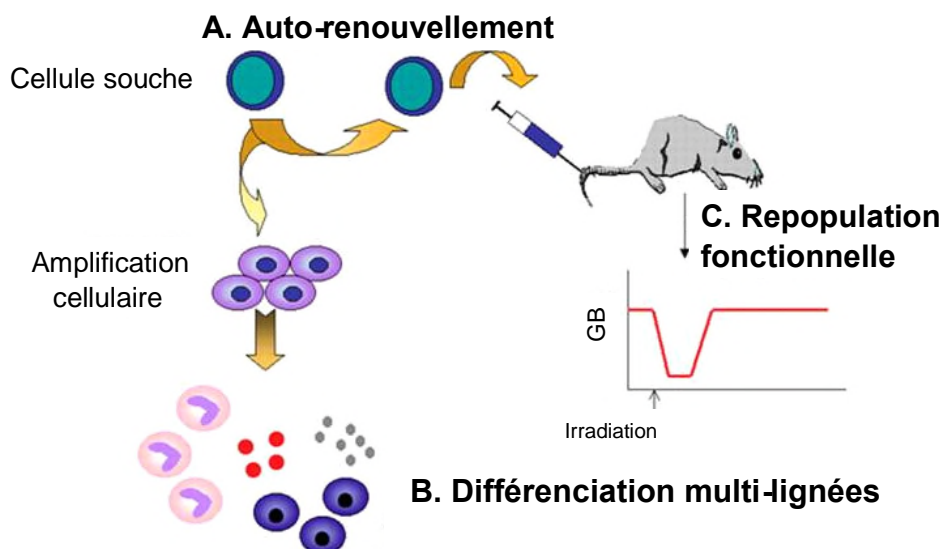


Figure 1 : Définition des cellules souches. Adapté de la figure de Verfaillie C. (Hematology 2002).

1.1. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) proviennent de la masse interne du blastocyste de l'embryon et ont la capacité de se répliquer indéfiniment *in vitro*. Il est donc possible de les cultiver et de les amplifier à large échelle, pré-requis nécessaire à la thérapie cellulaire. De plus, elles sont pluripotentes et peuvent se différencier en cellules d'origine endodermique, mésodermique ou encore ectodermique, y compris les cellules germinales.

1.2. Les cellules souches somatiques

Des cellules souches somatiques sont présentes chez les individus adultes; ces cellules sont multipotentes et se différencient en cellules spécifiques de leurs tissus d'origine. Elles présentent un potentiel certain en médecine régénérative autologue tout en ne soulevant pas les controverses éthiques liées aux CSE. Les cellules souches somatiques les plus étudiées sont les CSH et CSM.

1.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont à l'origine de toutes les cellules sanguines et du système immunitaire et peuvent reconstituer l'hématopoïèse à long terme d'un hôte irradié de façon létale, mais elles sont également capables de se greffer et se différencier chez des receveurs non-irradiés. Les CSH humaines expriment le CD34, CD45, AC133, Thy1 et cKit et sont négatives pour le CD38. Par contre, chez la souris, elles sont négatives pour le CD34 et expriment le Sca-1. Elles sont localisées dans le stroma médullaire mais sont également détectées dans le sang de cordon ombilical ou encore dans le sang périphérique (SP).

1.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses

Bien que dix fois moins nombreuses que les CSH, l'isolement de CSM à partir d'un prélèvement de moelle osseuse est relativement aisé par une méthode de centrifugation sur gradient de densité, puis par culture de la fraction adhérente. Il est également possible d'isoler des CSM par méthode immunomagnétique au moyen d'anticorps (Ac) qui reconnaissent des antigènes à la surface des CSM tel qu'un Ac anti-STRO-1 ou anti-SH2. Toutefois, les CSM constituent une population hétérogène de cellules du point de vue de leur morphologie, physiologie et expression d'antigènes de surface. Jusqu'à présent, aucun marqueur spécifique des CSM n'a pu être identifié. En culture *in vitro*, ces cellules ont une morphologie similaire à des fibroblastes et sont uniformément positives pour les marqueurs CD29, CD44, CD71, CD73 (SH3 et SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2, endogline), CD106 (VCAM-1, « vascular cell adhesion molecule »), CD120a, CD124, CD163 et Sca-1, tout en n'exprimant pas de marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux tels que le CD11b, CD14, CD31, CD34, CD45 et l'AC133. De nouveaux antigènes membranaires sont actuellement proposés pour l'isolation des CSM primaires dont STRO-1, CD49a, CD271, D7-Fib, GD2, un ganglioside neuronal¹, et SSEA-4, un antigène glycolipidique exprimé précocement sur les cellules pluripotentes des

embryons humains², sont les principaux. Toutefois, la présence de certains antigènes peut être modifiée *in vitro*, en fonction des conditions de culture ou des temps entre 2 passages³. Les CSM ont pu être isolées, non seulement à partir de la moelle osseuse, mais également du tissu adipeux⁴ et du sang de cordon ombilical⁵. Des CSM ont aussi été identifiées dans le SP⁶ et les tissus foetaux⁷.

Les CSM jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie de la moelle osseuse et dans la régulation de la maturation des cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Ces cellules forment une niche pour les CSH, leurs fournissant des sites d'ancrage et de développement favorables grâce à un contact physique avec un stroma médullaire approprié. En effet, elles sécrètent un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire tels que la laminine, la fibronectine et des protéoglycans, mais produisent également des facteurs de croissance, chémokines et cytokines comme par exemple, IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, « macrophage colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF), « leukemia inhibitor factor », « stem cell factor » (SCF), « fetal liver tyrosine kinase-3 », thrombopoïétine et « hepatocyte growth factor » (HGF)⁸. Elles soutiennent donc activement l'hématopoïèse.

Les CSM donnent également naissance aux tissus conjonctifs du squelette (stroma médullaire, os, cartilage, adipocytes, tendon, muscle lisse...).

In vitro, les CSM sont amplifiées de façon importante, bien que le nombre de doublement reste généralement inférieur à 50 et que l'on puisse observer un raccourcissement des télomères sans activité télomérase détectable⁹. De plus, des publications récentes décrivent qu'au fur et à mesure des passages, les CSM présentent des anomalies morphologiques et des modifications du pattern de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN¹⁰. *In vivo*, bien que le tissu hématopoïétique soit renouvelé en quelques semaines, le tissu osseux ne l'est qu'après plusieurs années.

La présence de CSM indifférenciées après la culture primaire *ex vivo*, est garantie par l'analyse de la capacité de ces cellules à se différencier en cellules provenant aussi bien de l'ectoderme et du mésoderme que de l'endoderme (par exemple, en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes, hépatocytes, neurones, myocytes et cellules endothéliales et épithéliales).

Verfaillie et al. identifient, à partir de la moelle osseuse humaine et murine, des cellules qualifiées de « multipotent adult progenitor cells » (MAPC)¹¹. Ce sont des cellules pluripotentes, au potentiel proche de celui des CSE, mais ne présentant pas l'inconvénient de

développement tumoral après administration chez l'animal. Les MAPC présentent un potentiel de différenciation plus large que celui des CSM décrites précédemment. En effet, une différenciation neurale est décrite *in vitro*, tandis qu'*in vivo*, une différenciation hématopoïétique a pu être observée. Elles ont également la capacité de générer des souris chimériques lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyte¹². De plus, elles présentent une activité télomérase positive. Les MAPC sont obtenues après une sélection négative suivie d'une culture de quelques jours des cellules CD45⁺/Glycophorine A⁺ chez l'humain et CD45⁺/TER119⁺ chez le rongeur.

Le caractère multipotent et le pouvoir immunomodulateur des CSM en font de bonnes candidates pour des utilisations en thérapie cellulaire et pour des interventions immunomodulatrices. Les CSM sont capables de moduler la réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo*¹³. En effet, les CSM n'expriment pas les molécules de costimulation (B7-1, B7-2 et CD40), même en présence d'interféron γ (IFN- γ). Par contre, elles peuvent exprimer les molécules du CMH de classe II sous stimulation par cette cytokine. Les CSM suppriment de façon réversible la capacité des lymphocytes T humains à proliférer et ce, aussi bien par l'intermédiaire de facteurs solubles, que via un contact inter-cellulaire^{14,15}. De plus, les CSM peuvent avoir un impact sur d'autres cellules participant à la réponse immune, tels que les lymphocytes B¹⁶, les cellules dendritiques¹⁷ et les cellules « natural killer » (NK)¹⁸. Toutefois, les mécanismes exacts de cet effet immunomodulateur restent à découvrir. L'utilisation clinique des CSM a été décrite dans plusieurs types de pathologie. En hématologie, la greffe de CSH a été associée à celle de CSM autologues pour améliorer la prise de la greffe et éviter un rejet allogénique^{19,20}. Un des exemples *in vivo* le plus impressionnant des effets immunosuppresseurs de ces cellules est le contrôle, par une greffe de CSM allogéniques, de cas de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)^{21,22}. L'ensemble des effets immunomodulateurs potentiels des CSM sont résumé à la figure 2. Toutefois, des études menées chez des rongeurs et chez le porc ont montré que les CSM pouvaient induire une réponse immunitaire primaire²³⁻²⁵.

La thérapie cellulaire par des CSM a été réalisée dans différentes pathologies ostéo-articulaires. L'ostéogenèse imparfaite (OI) est une maladie génétique caractérisée par une fragilité osseuse. Cette pathologie est généralement due à une anomalie de la production du collagène. L'allogreffe de moelle a permis, chez des enfants atteints d'OI, une reprise transitoire de la croissance, une baisse du taux de fracture et une amélioration de la minéralisation osseuse²⁶. Ces résultats sont encourageants pour l'utilisation clinique des CSM et démontrent la transplantabilité et l'efficacité de la thérapie cellulaire par CSM.

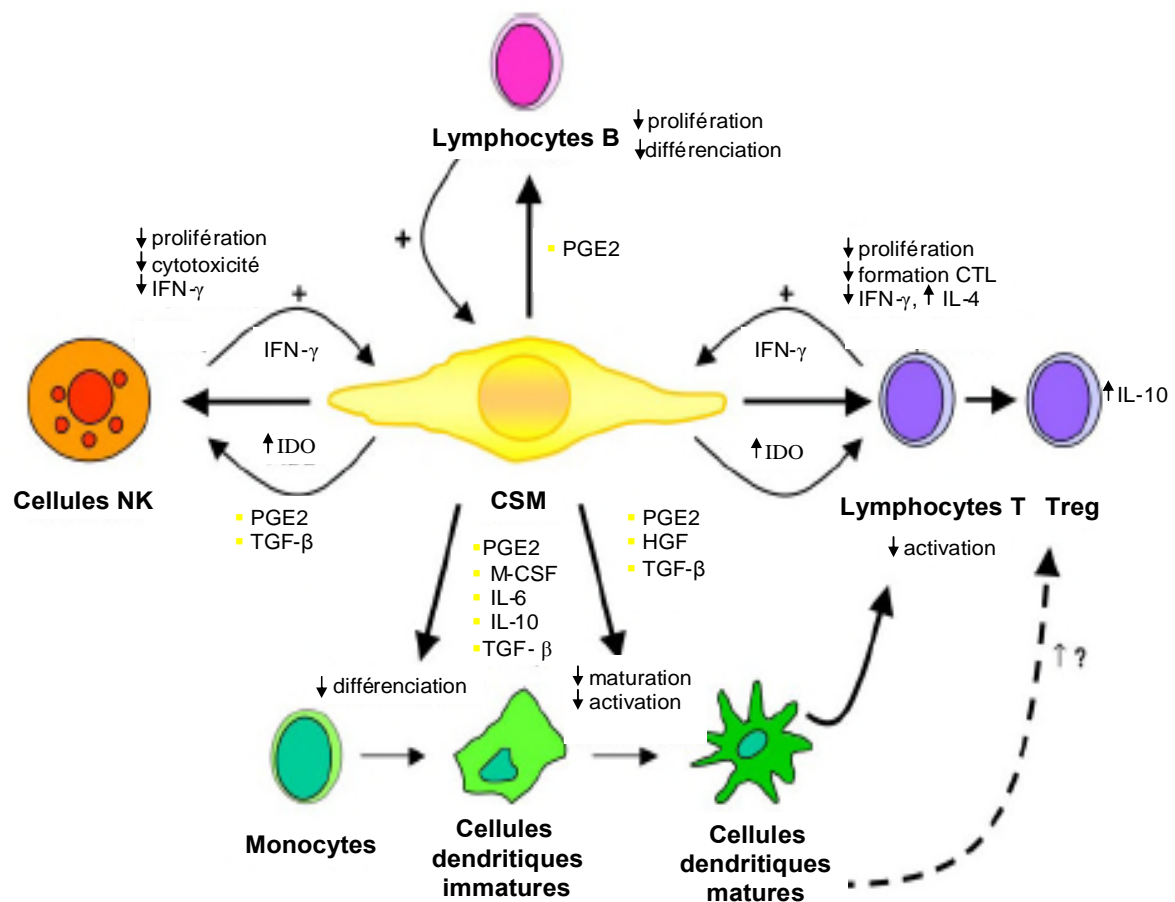


Figure 2 : Résumé des effets immunomodulateurs des CSM. CTL = Lymphocytes T cytotoxiques; HGF = « hepatocyte growth factor »; IDO = « indoleamine 2,3-dioxygénase »; PGE2 = prostaglandine E2 ; TGF-β = « transforming growth factor β ». Adapté de la figure d'Alma J (Blood 2007).

1.2.2.1. Différenciation des CSM en cardiomyocytes par de la 5-azacytidine

La différenciation des CSM a été rapportée pour la première fois en 1999²⁷. La culture de clones de cellules stromales médullaires de souris en présence de 5 azacytidine induit leur différenciation en cardiomyocytes. Les CSM différenciées présentent alors un battement rythmique et spontané et des potentiels d'action similaires à ceux des cardiomyocytes. De plus, ces cellules expriment Gata-4, l'homéobox Nkx-2.5 et le « myocyte-specific enhancer factor-2 » (MEF-2), des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cardiomyocytaire. La 5-azacytidine est un agent déméthylant qui agit donc sur la méthylation de certains loci liés à la différenciation myogénique. Ces séquences génomiques transcriptionnellement inactivées des CS sont alors plus accessibles, ce qui permet d'activer les voies aboutissant à une différenciation myogénique. Cependant, l'action du 5 azacytidine induit également l'expression non contrôlable d'autres gènes. Le traitement des CSM par de la 5-azacytidine n'est cependant pas suffisant pour générer des cardiomyocytes matures en nombre suffisant pour permettre leur utilisation en thérapie cellulaire de réparation cardiaque. Cependant, l'exposition à de la 5-azacytidine, antérieurement à une greffe dans le tissu

cardiaque lésé, accélère et améliore la différenciation locale des CSM en cardiomyocytes mais stimule aussi l'angiogenèse. Des études *in vivo* ont montré la nécessité de cette pré-programmation *in vitro* avant l'implantation dans le tissu cardiaque afin d'obtenir une différenciation des CSM en myocytes cardiaques^{28,29}.

1.3. Plasticité des cellules souches adultes

La capacité des cellules souches d'un tissu spécifique à acquérir, dans un microenvironnement particulier, les caractéristiques et propriétés de différents types cellulaires provenant de tissus d'origine différente, est appelée la plasticité des cellules souches adultes. On distingue : (1) les cellules totipotentes, capables de former toutes les cellules différenciées du corps, y compris les cellules trophoblastiques et du placenta ; (2) les cellules pluripotentes, capables de se différencier en cellules des 3 tissus embryonnaires mais incapables de former des cellules du placenta ; et (3) les cellules multipotentes, qui peuvent quant à elles produire un nombre limité de cellules différenciées appartenant à un tissu précis. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette plasticité (Fig.3) :

(1) Des CS d'origines différentes peuvent être présentes dans un même organe. Cela semblerait être le cas du muscle, comme observé dans deux études qui démontrent une repopulation du système hématologique après une transplantation de cellules musculaires chez des souris irradiées de façon létale^{30,31}.

(2) La plasticité est le résultat de la fusion des CS du donneur avec des cellules résidant dans un organe.

(3) Des cellules peuvent réellement se transdifférencier ou se dédifférencier puis se redifférencier. Les études menées sur « Dolly » sont des exemples clairs prouvant que l'information génétique d'une cellule peut être reprogrammée et qu'une cellule somatique peut se dédifférencier en cellules pluripotentes³². Les CS adultes pourraient donc être reprogrammées lorsqu'elles sont soustraites de leur microenvironnement et introduites dans une nouvelle niche dans laquelle des signaux activent un nouveau programme génétique les menant à un second destin.

(4) Des CS multi ou pluri-potentes persistent chez l'adulte. Par exemple, les MAPC peuvent être différenciées *in vitro* en cellules présentant des propriétés d'origine mésodermique, endodermique et ectodermique³³.

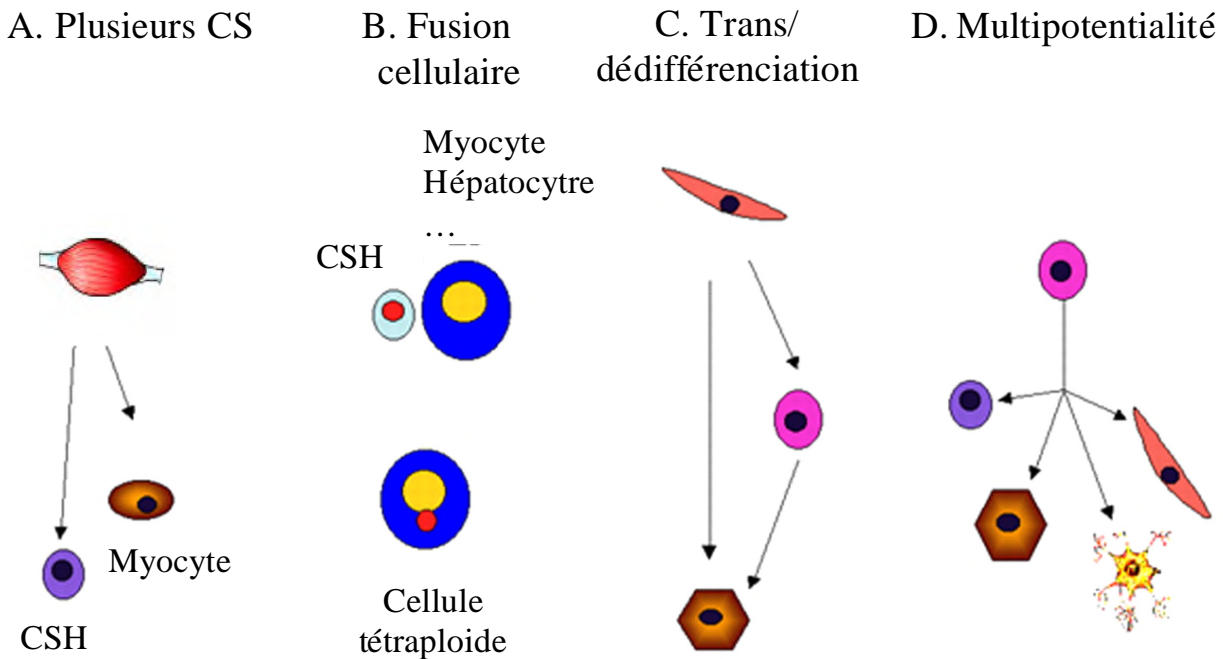


Figure 3 : Plasticité cellulaire : mécanismes possibles. Adapté de la figure de Verfaillie C. (Hematology 2002).

2. Pathologies cardiaques

2.1. Le cœur normal

Le cœur humain pourrait être comparé à une pompe qui propulse 6000 litres de sang par jour, ce qui fournit aux tissus l'oxygène et les nutriments vitaux et permet l'élimination des déchets métaboliques.

Le myocarde se compose de cellules musculaires striées. Les contractions de ce muscle sont non volontaires et sont le résultat du glissement des filaments d'actine entre les filaments de myosine jusqu'au centre de chaque sarcomère. D'autre part, des myocytes excitables, spécialisés dans la conduction de l'influx électrique (système de conduction cardiaque), sont impliqués dans la régulation du rythme cardiaque. Les « gap junctions » tiennent un rôle dans la synchronisation de la contraction des myocytes, grâce aux passages d'ions au travers de la membrane de cellules voisines. Les myocytes comptent seulement pour 25% des cellules du cœur. Les autres cellules sont des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, le plus souvent associées à un riche réseau capillaire, ainsi que des cellules du tissu conjonctif. Le cœur était jusqu'à ces dernières années considéré comme un organe terminal, la réponse principale aux dommages du myocarde étant une hypertrophie des cardiomyocytes viables. Cependant, de nouvelles études ont démontré que le cœur semble avoir un réservoir de cellules progénitrices.

2.2. Les cellules progénitrices cardiaques

Au cours du développement embryonnaire, les cellules cardiaques dérivent du mésoderme. La mise en évidence chez l'adulte de myocytes en mitose implique la présence dans le cœur d'une population de cellules souches ou progénitrices cardiaques (CPC) résidant dans le myocarde. Ces cellules ne sont pas suffisantes (0,08% des cardiomyocytes) en cas de perte aiguë d'un grand nombre de cellules mais pourraient remplacer les cellules apoptotiques à un niveau basal tout au long de la vie. Les CPC sont plus petites que les cardiomyocytes, n'expriment pas les marqueurs cardiaques et sont capables de s'autorenouveler et de proliférer. Des CPC ont pu être isolées à partir de cœurs de rat et cultivées *in vitro*. Elles présentent un comportement proche de celui des CS mais ne peuvent se différencier que dans la lignée cardiomyogénique. Ces cellules amplifiées contiennent des clones de cellules Lin-, c-Kit+ et beaucoup d'entre-elles expriment GATA-4 et Nkx2.5, deux facteurs de transcription liés au développement cardiaque précoce. Ces cellules sont capables de former de larges zones contenant de nouveaux myocytes et vaisseaux sanguins³⁴. Les mêmes propriétés ont été démontrées dans des populations de cellules Sca-1+ chez la souris³⁵ et Sca-1+, c-Kit+ et MDR-1+ isolées à partir du cœur humain³⁶. L'origine de ces cellules primitives reste incertaine : elles peuvent être des résidus de la vie fœtale ou encore provenir de la circulation ou de la moelle osseuse. Cependant, aucune cellule présentant des propriétés similaires à celles des CPC n'a pu être isolée à partir du SP. Néanmoins, des cellules exprimant des marqueurs cardiaques précoces (Nkx2.5/Csx, GATA-4 et MEF2C) ont pu être mises en évidence dans la moelle osseuse et sont mobilisées en périphérie après un infarctus du myocarde³⁷.

2.3. Maladies ischémiques cardiaques

Les pathologies obstructives des artères coronaires sont une cause majeure de dysfonction cardiaque, menant à des remodelages structurels qui aboutissent à un arrêt cardiaque. Les maladies cardiaques sont dans les nations industrialisées, une étiologie prédominante d'invalidité et de mortalité aussi bien chez l'homme que chez la femme. Le poids du cœur normal varie en fonction de la masse corporelle. L'augmentation de la taille et du poids du cœur accompagne beaucoup de formes de maladies cardiaques et porte le nom d'hypertrophie. La dilatation consiste en une augmentation de la taille d'une cavité cardiaque. Plus spécifiquement, l'ischémie cardiaque (IC) résulte d'un déséquilibre entre la perfusion et les véritables besoins du cœur en sang oxygéné. Le tissu cardiaque souffre non seulement

suite à l'insuffisance en oxygène mais également par la réduction des substrats et une accumulation des métabolites. Dans plus de 90% des cas, la cause d'ischémie myocardique est due à une réduction du flux sanguin coronaire suite à l'obstruction d'une artère coronaire par une plaque d'athérosclérose. L'infarctus du myocarde (IM) est la forme la plus importante d'IC dans laquelle la durée et la sévérité de l'ischémie sont suffisantes pour induire la mort du muscle cardiaque. L'occlusion d'une artère coronaire majeure résulte en l'ischémie et la mort cellulaire potentielle dans la zone anatomique du cœur irriguée par cette artère, appelée région à risque. Le remodelage ventriculaire est le processus qui survient suite à un IM aigu. Il englobe, d'une part, la perte de cardiomyocytes par apoptose et nécrose aboutissant à l'espacement des cellules contractiles, et d'autre part, l'amincissement de la paroi du ventricule gauche (VG), mais aussi la dilatation du VG ainsi que l'accumulation de collagène. Ces altérations architecturales complexes surviennent non seulement dans la zone infarctée mais également dans le tissu cardiaque sain après un IM. En effet, des effets compensatoires par hypertrophie, dilatation et hyperkinésie des territoires non ischémiés apparaissent³⁸. Bien que ce remodelage cardiaque soit initialement une réponse adaptative, il conduit progressivement à une dilatation menant à une insuffisance cardiaque par congestion.

Des modèles animaux d'IC existent et consistent en une ligature d'une artère coronaire suivie ou non d'une reperfusion. D'un point de vue anatomique, l'artère coronaire du cœur murin présente davantage de collatérales que celle de l'être humain, ce qui permet de bien cibler la zone à risque en fonction de l'endroit de l'occlusion.

3. La thérapie cellulaire et la réparation tissulaire cardiaque

La restauration cardiaque suite à un IM nécessiterait le remplacement des myocytes endommagés et la restauration du flux sanguin, et ce, afin de limiter le remodelage du ventricule gauche et de sauver les cardiomyocytes hibernants. Les CS présentent un potentiel intéressant pour la réparation tissulaire cardiaque au vu de leurs capacités à se différencier *in vitro* en cardiomyocytes et en cellules endothéliales. La thérapie cellulaire nécessite l'apport de cellules soit d'une façon systémique soit par des injections intra-cardiaques localisées. Les cellules greffées doivent alors proliférer pour former un nouveau tissu, puis se différencier en cardiomyocytes fonctionnels couplés mécaniquement et électriquement avec le cœur receveur (Fig.4). En fonction de leur origine, les cellules peuvent emprunter des voies différentes pour leur survie, leur différenciation et leur fonctionnement dans le tissu cible. Afin de garantir la sécurité et l'efficacité de la thérapie cellulaire, plusieurs paramètres doivent être contrôlés : la

voie d'injection, le type de cellules, la dose, le timing d'injection par rapport à la survenue de l'ischémie et les traitements adjuvants, tels que les facteurs induisant la mobilisation des CS.

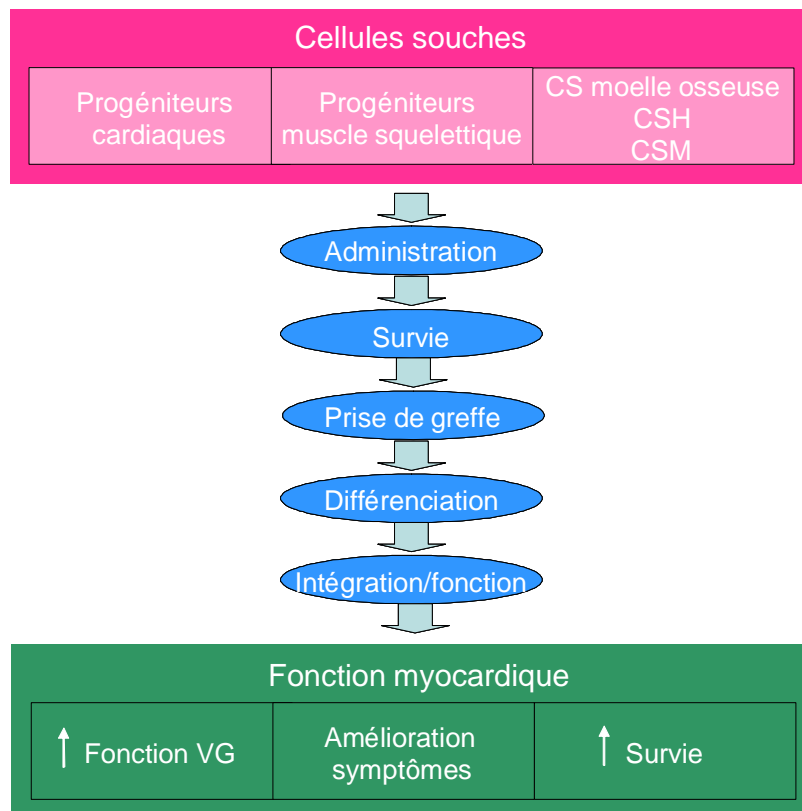


Figure 4 : Etapes nécessaires à la cardiomyoplastie. VG : ventricule gauche. Adapté de la figure de Weissberg P.L. (Heart 2006).

3.1. Voies d'injection des cellules

L'objectif de toute stratégie de greffe cellulaire est d'assurer la transplantation et la rétention d'un nombre suffisant de cellules dans la région d'intérêt du myocarde. Les cellules progénitrices peuvent être délivrées au cœur, soit par greffe dans le SP, soit par injection directement dans le myocarde lésé, ou encore, être mobilisées à partir de la moelle osseuse. L'avantage de la délivrance de cellules en intra-coronaire, par exemple en utilisant des ballons de dilatation, est que les cellules peuvent migrer dans des régions du myocarde où l'apport en nutriments et oxygène est conservé, ce qui facilite leur survie : cela est un prérequis indispensable à leur différenciation ultérieure. D'autre part, cette voie d'administration évite un premier passage dans les poumons qui emprisonnent beaucoup de cellules dans le cas de l'injection systémique. Cependant, cela nécessite le homing des cellules du SP vers une région du cœur mal vascularisée. De plus, si les CS de la moelle sont connues pour migrer dans les sites inflammatoires, il n'en est pas de même pour les myoblastes squelettiques qui peuvent obstruer la microcirculation après l'injection intra-coronaire et conduire à d'autres dommages

du tissu cardiaque par embolie. La greffe des cellules progénitrices, directement dans le site ischémié (injection dans l'épicarde ou l'endocarde), n'est, quant à elle, pas limitée par le homing à partir de la circulation générale ou par les risques d'embolie. Cependant, le risque chirurgical est plus grand et l'environnement n'est pas favorable à la prise de la greffe. En effet, beaucoup de cellules injectées directement dans le muscle cardiaque meurent. Cependant, la co-transplantation des cellules et de bio matrice a significativement amélioré la prise de greffe et diminué la mortalité cellulaire^{39,40}.

Le destin des cellules greffées est non seulement influencé par les conditions locales mais également par le moment de l'implantation. En effet, lorsque les CS sont introduites dans la zone infarctée à un stade précoce de la lésion myocardique, un taux élevé de mort cellulaire et un échec thérapeutique surviennent. Cela s'explique par l'inflammation locale et la faible disponibilité en facteurs vitaux. De plus, les CS indifférenciées comme les CSM peuvent se différencier en fibroblastes lorsqu'elles se trouvent dans un microenvironnement fibrogénique comme celui rencontré au cours de la formation cicatricielle.

3.2. Origine des cellules utilisables en thérapie cellulaire cardiaque

De nombreuses études cliniques ont étudié et évalué encore le potentiel pour la thérapie cellulaire cardiaque de cellules progénitrices adultes d'origines différentes. Théoriquement, plusieurs types de cellules souches et progénitrices peuvent être utilisées pour la réparation cardiaque. Cependant, chaque type de cellules possède ses propres avantages, limitations et aspects pratiques, surtout pour les études cliniques. Les cellules autologues présentent l'avantage d'éviter le rejet de la greffe. Deux principaux mécanismes d'action sont envisagés pour la participation des CS à la restauration tissulaire cardiaque: une différenciation en cardiomyocytes et cellules endothéliales ou une production de facteurs paracrines (Fig.5.). Différentes sous-populations de CS peuvent combiner plusieurs propriétés comme par exemple, une sous-population peut libérer des facteurs de croissance qui agiront sur les cellules endommagées du cœur, alors qu'une autre peut, à une fréquence plus faible, se différencier dans les différentes lignées des cellules du muscle cardiaque⁴¹. Plus particulièrement, les effets paracrines des CS sur le muscle cardiaque ischémié sont multiples : 1) sécrétion de facteurs qui stimulent la prolifération et réduisent l'apoptose ; 2) production de facteurs qui recrutent les cellules progénitrices circulantes ou résidant dans le cœur ; 3) diminution de l'inflammation ; 4) limitation de la fibrose et du remodelage tissulaire et 5) induction de l'angiogenèse⁴².

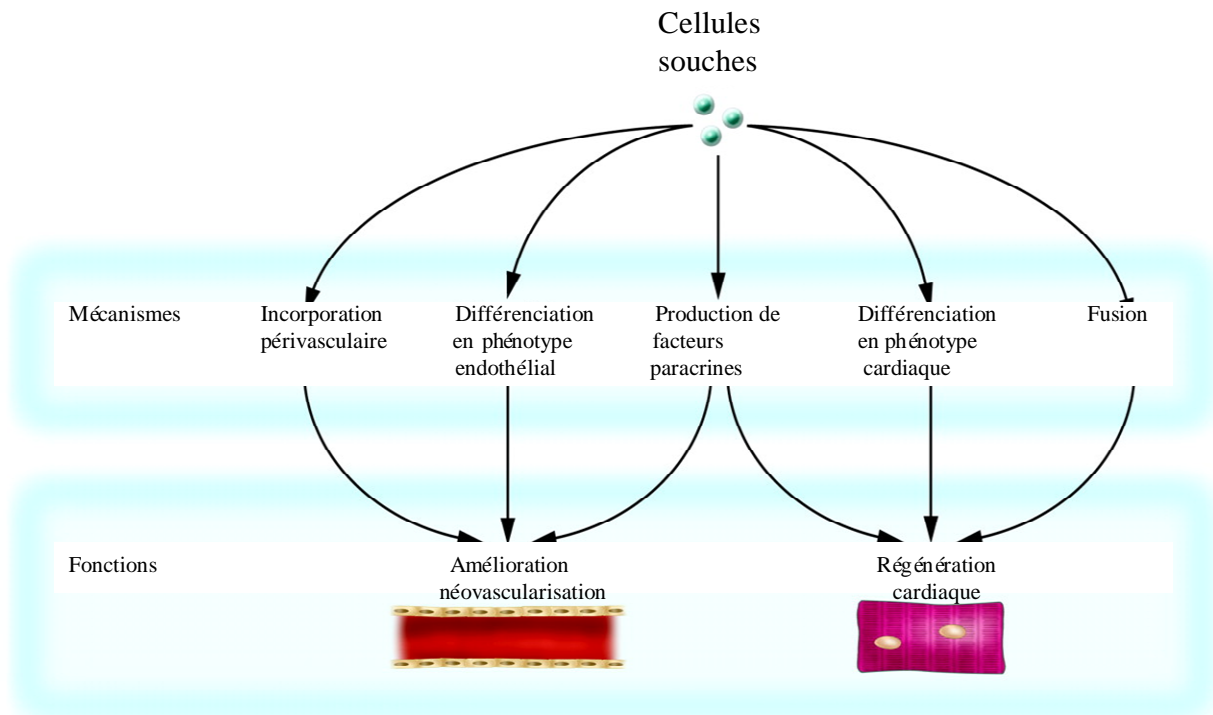


Figure 5: Mécanisme d'action des cellules souches sur le tissu cardiaque lésé. Adapté de la figure de Dimmeler S. (J Clin. Invest. 2005).

3.2.1. Les péricytes du muscle squelettique

Les premières cellules présentant un intérêt clinique pour la thérapie cellulaire cardiaque sont les cellules indifférenciées du muscle squelettique assurant un rôle de progéniteur au muscle strié, appelées péricytes. Ces cellules, très résistantes à l'ischémie, ont montré qu'elles pouvaient survivre dans le tissu cardiaque lésé et participer à l'amélioration de la fonction cardiaque^{43,44}. Cependant, il semblerait qu'elles n'expriment pas les marqueurs cellulaires des cardiomyocytes adultes, ni les « gap junctions » nécessaires au transport de petites molécules et d'ions entre cardiomyocytes. Il en résulte une absence de connexion avec les cellules résidentes et la présence de battements indépendants des signaux électriques cardiaques ce qui crée des extrasystoles.

3.2.2. Cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (CSE) ont la capacité de se répliquer indéfiniment, ce qui rend possible les cultures à large échelle, un prérequis nécessaire à la thérapie cellulaire. De plus, par leur caractère pluripotent, les CSE peuvent se différencier dans toutes les cellules constituant le corps humain, y compris en cardiomyocytes, bien que

les CSE humaines présentent un potentiel de différenciation en cellules cardiaques plus faible que les murines^{45,46}. Pour une application pratique en réparation cardiaque, les CSE doivent pouvoir se différencier en cardiomyocytes. *In vitro*, les CSE peuvent former des corps embryonnaires qui sont des sphères organisées en plusieurs couches de cellules différenciées qui se contractent spontanément après quelques jours de culture et possèdent un phénotype myocardique⁴⁷. *In vivo*, le G-CSF semble intervenir de façon critique dans la prolifération des cardiomyocytes pendant le développement embryonnaire et peut être utilisé pour induire la différenciation de CSE en cardiomyocytes⁴⁸. La différenciation de CSE en cardiomyocytes est également possible dans une culture primaire au contact de cardiomyocytes matures ou en présence de 5-azacytidine⁴⁹. L'inhibition de la voie de signalisation de la « bone morphogenetic protein » (BMP), l'acide rétinoïque, l'oxyde nitrique (NO) ou encore l'« insulin growth factor-1 » (IGF-1) induisent également la différenciation des CSE de souris en cardiomyocytes. L'augmentation du stress oxydatif semble, d'autre part, réduire le phénotype cardiaque des corps embryonnaires⁵⁰. La capacité des CSE de remplacer les cardiomyocytes endommagés a également été étudiée *in vivo*, dans des modèles murins et porcins. Les CSE apportent un bénéfice fonctionnel et contribuent à la formation d'un nouveau tissu cardiaque viable. Cependant, il existe deux principales limitations à l'utilisation des CSE en thérapie cellulaire. Premièrement, leur origine allogénique peut résulter en leur rejet par le système immunitaire de l'hôte, et, deuxièmement, l'isolation des CSE est au centre de débats éthiques, non seulement de par leur origine, mais également, parce qu'elles sont par définition tumorigènes puisque indifférenciées.

3.2.3. Cellules souches hématopoïétiques

Les premières indications du potentiel de régénération cardiaque *in vivo* des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont été obtenues dans un modèle d'ischémie suivie d'une reperfusion cardiaque chez la souris. Ces animaux, irradiés de façon létale, sont greffés avec une population de CSH appelée « Side population » (CD34⁻, C-Kit⁺, Sca-1⁺) et des cardiomyocytes, d'origine du donneur, ont pu être détectés autour de la zone de l'infarctus⁵¹. Un second modèle consiste en l'injection de cellules Lin⁻, c-Kit⁺ directement en périphérie de la paroi ischémisée. Approximativement 68% des cellules dans la zone de l'infarctus sont remplacées par des nouveaux cardiomyocytes et les cellules du donneur se différencient non seulement en cardiomyocytes mais également en cellules endothéliales et fibroblastes⁵². Cependant, des résultats similaires n'ont pu être obtenus par des études ultérieures. De plus, dans un modèle de primates ligaturés, des cellules CD34⁺ transduites par le gène GFP

(« green fluorescent protein ») et injectées en IC n'ont pas pu être mises en évidence dans le cœur 3 mois après l'IM et aucun effet positif n'a pu être noté⁵³. Malgré leur capacité importante de homing, la contribution des CSH à la régénération du myocarde reste controversée.

3.2.4. Précurseurs circulants des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales et les cellules sanguines proviennent d'un précurseur commun appelé hémangioblaste. Les progéniteurs endothéliaux (PE) sont habituellement définis par leur capacité à former en culture des colonies composées de cellules allongées ou par des caractéristiques fonctionnelles (capacité d'incorporer le LDL (« Low density lipoprotein ») ou de se lier au facteur de von Willebrand (vWF)). D'autre part, elles expriment des protéines spécifiques de la lignée endothéliale (« vascular endothelial growth factor receptor-2 » (VEGFR-2), CD31) et hématopoïétique (AC133, CD34) bien que négatives pour le CD45⁵⁴. Elles ont été isolées à partir de moelle osseuse et identifiées dans la circulation générale. Plusieurs études ont montré que les PE sont mobilisés en réponse à l'ischémie, s'incorporent dans le muscle cardiaque et améliorent la perfusion. Cependant, les PE sont très rares dans le SP et difficiles à isoler. En effet, aucune certitude n'a encore émergé quant à leur phénotype, ce qui rend ces cellules actuellement difficilement utilisables en thérapie cellulaire.

3.2.5. Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont largement été étudiées pour leur capacité cardiomyogénique *in vivo*, depuis que leur potentiel de différenciation en cardiomyocytes *in vitro* a été démontré. Les CSM forment des cardiomyocytes lorsqu'elles sont injectées dans un cœur sain de souris, expriment des marqueurs cardiaques et aussi la connexine-43, suggérant qu'elles entrent en communication avec les cellules du receveur⁵⁵. Lorsque les CSM sont administrées chez des rats présentant un dommage cardiaque, elles expriment, 8 semaines après l'induction de la lésion, les protéines cardiaques troponine I et la chaîne lourde de la myosine. Fazel et al. n'ont cependant pas pu mettre en évidence la régénération de cardiomyocytes après l'injection de CSM chez des souris ligaturées. Toutefois, ils ont rapporté une augmentation de la mobilisation des PE dans le tissu lésé et une amélioration de la fonction cardiaque⁵⁶. Iso et al. ont observé que malgré une absence de greffe persistante des CSM dans le cœur, ces cellules sont à l'origine d'effets positifs sur les

dysfonctions cardiaques induites par l'ischémie. Ces effets bénéfiques semblent être attribuables à la sécrétion de facteurs paracrines⁵⁷. De plus, la greffe de CSM pré-traitées avec de la 5-azacytidine diminue la taille de l'infarctus et améliore la fonction cardiaque par rapport aux animaux contrôles²⁹.

En plus de leurs nombreux intérêts présentés au paragraphe 1.2., les CSM sont de bonnes candidates pour la thérapie génique. En effet, ces cellules peuvent facilement être transduites par des virus afin d'apporter des gènes permettant l'amélioration de la survie des cellules, un avantage sélectif ou encore une propriété propre à un tissu. Par exemple, une restauration de 80% du tissu cardiaque lésé ainsi qu'une normalisation de la fonction cardiaque est obtenue dans un modèle d'ischémie cardiaque dans lequel les CSM injectées sont transduites avec le gène anti-apoptotique Akt⁵⁸. Ces nombreuses études démontrent le grand potentiel des CSM en thérapie cellulaire de réparation tissulaire cardiaque. De plus, les avancées réalisées dans les secteurs des nanotechnologies et biomatériaux offrent de nouvelles perspectives pour délivrer les cellules et leur permettre une prise de greffe et une survie améliorées. Deux publications récentes ont en effet allié l'utilisation de matrice et de MSC avec des résultats encourageants sur la fonction cardiaque^{59,60}.

3.3. Effets indésirables de la thérapie cellulaire

Le destin à long terme des CS injectées dans différents organes est mal connu, mais, contrairement aux CSE, aucun phénomène de néoplasie n'a été rapporté après l'injection systémique de cellules somatiques. Cependant, les cellules amplifiées en culture peuvent théoriquement présenter un danger par accumulation de mutations génétiques. La fusion de CS avec les cellules d'un tissu déterminé peut également présenter des risques puisque les cellules hyperploïdes sont instables, ce qui peut induire la perte du contrôle de leur croissance. Et enfin, par leur capacité à participer aux phénomènes de vasculogénèse et d'angiogénèse, les CS peuvent améliorer la vascularisation des tissus tumoraux conduisant à une croissance plus rapide. D'autre part, un phénomène de calcification a été décrit dans un modèle chez le rat. Dans cette étude, les rats ligaturés étaient injectés avec des cellules complètes de la moelle osseuse. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène de calcification : tout d'abord, les CSM de la moelle ont la capacité de se différencier en ostéoblastes et ensuite, la calcification peut être induite suite à l'interaction des cellules de la moelle et de la zone infarctée, ou encore, les différents types de cellules de la moelle osseuse interagissent entre elles dans un nouvel environnement.

3.4. Etudes cliniques

Les résultats encourageants de la réparation tissulaire obtenus par les CS dans les modèles animaux de pathologies cardiaques, ont conduit à l'élaboration des premières études cliniques. Chang et al. ont montré qu'ils pouvaient collecter un nombre suffisant de SC dans le SP de patients avec un IM sans complication, dans le but de réinjecter ces cellules en intra-coronaire. Toutefois, la collecte est meilleure chez les patients souffrant d'un infarctus aigu par rapport à des ischémies plus anciennes⁶¹. Les études TOPCARE-AMI (« Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction ») chez des patients souffrant d'un infarctus aigu du myocarde et TOPCARE-CHD (« Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Chronic heart disease ») chez des sujets présentant une pathologie ischémique chronique du myocarde, réalisées respectivement en 2002 et 2007, ont démontré non seulement que l'injection intra-coronaire de cellules ne présente pas de risques mais également l'effet positif de la greffe de cellules autologues de la moelle osseuse ou du SP sur la fraction d'éjection et le volume du ventricule gauche^{36,62,63}. D'autres études à long terme, randomisées (étude BOOST) ou non, réalisées chez des patients souffrant d'un infarctus du myocarde et injectés avec des cellules de la moelle dans le myocarde sain, montrent une amélioration de la perfusion et de la fonction cardiaque⁶⁴⁻⁶⁶. L'ensemble des études cliniques réalisées chez des patients souffrant d'ischémie aiguë ou chronique est résumé aux tableaux 1 et 2. Afin de limiter au maximum les risques, une étude pilote a montré que l'administration de CS mobilisées par du G-CSF en intra-coronaire, reportée à 4 semaines après la pose du stent coronaire, mais à moins de 3 mois de l'infarctus, améliore la fonction cardiaque sans déclencher de resténose⁶⁷.

Des résultats homogènes sont cependant difficiles à mettre en exergue, étant donné que la nature des cellules injectées, les voies d'injection et la physiopathologie précise menant à l'insuffisance cardiaque varient d'une étude à l'autre. Malgré ces premiers résultats encourageants, des recherches complémentaires sont nécessaires avant de garantir la sécurité de la thérapie cellulaire de restauration cardiaque. D'autre part, l'incidence des problèmes cardiaques chroniques étant en augmentation, il serait également intéressant d'envisager l'effet thérapeutique des CS dans de telles pathologies. De nombreuses études sont également menées sur l'intérêt de la mobilisation des CS par des facteurs de croissance tel que le « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF) dans le cas d'ischémie cardiaque.

3.5. La thérapie génique

La combinaison de la thérapie cellulaire et de la thérapie génique est une nouvelle technologie attractive à développer pour traiter les maladies cardiaques. La surexpression ou l'inhibition de la production de certaines protéines spécifiques peuvent résulter en un changement du phénotype cardiaque. Les fonctions spécifiques des cardiomyocytes comprenant les canaux à ions, la conduction cardiaque et la contractilité des myocytes peuvent être modifiées par le transfert de gènes et l'expression de protéines spécifiques. Des premiers essais ont déjà montré des résultats intéressants, notamment la greffe de CSM génétiquement modifiées qui a permis une augmentation de l'expression de protéines canaux impliquées dans l'activité pacemaker du cœur. Cette transplantation s'exprimait *in vivo* par une modification du rythme cardiaque⁶⁸. L'injection de MSC modifiées pour surexprimer le « stromal cell-derived factor-1 » (SDF-1) chez des rats présentant un infarctus du myocarde a conduit à une amélioration plus importante de la fonction cardiaque que lorsque des cellules non manipulées étaient administrées. Ce résultat semble être dû à un effet protecteur du SDF-1 directement sur les CS mais aussi sur les cardiomyocytes⁶⁹. Dans un modèle animal de cardiomyopathie, l'introduction de myoblastes squelettiques transfectés avec un adénovirus contenant le gène codant le VEGF, a davantage amélioré l'angiogenèse et la fonction du ventricule gauche que l'injection d'adénovirus seul⁷⁰.

Tableau 1 : Etudes cliniques randomisées ou non chez des patients souffrant d'infarctus du myocarde aigu.

	N Traités/Contrôles	Voie d'administration	Type cellulaire	Suivi (mois)	Résultats
<i>Etudes non randomisées</i>					
Strauer <i>et al.</i> ⁶⁶	10/0	IC	CMMO	3	Sans danger (faible amélioration FEVG)
Fernandez-Avilés <i>et al.</i> ⁶⁴	20/0	IC	CMMO	6	Sans danger (faible amélioration FEVG)
TOPCARE-AMI ⁶²	59*/0	IC	CMMO/ CPC	12	Sans danger (faible amélioration FEVG et diminution taille infarctus)
Bartunek <i>et al.</i> ⁷¹	19/16	IC	CD133+ MO	4	Amélioration FEVG
<i>Etudes randomisées</i>					
BOOST ⁶⁵	30/30	IC	CMMO	18	Amélioration FEVG à 6 mois mais pas à 18 mois
ASTAMI ⁷²	47/50	IC	CMMO	6	Pas amélioration FEVG
Janssens <i>et al.</i> ⁷³	33/34	IC	CMMO	4	Pas amélioration FEVG, amélioration fonction régionale et diminution taille de l'infarctus
REPAIR-AMI ⁷⁴	102/102	IC	CMMO	12	Amélioration FEVG à 4 mois
Chen <i>et al.</i> ⁷⁵	34/35	IC	CSM	6	Amélioration FEVG
MAGIC-CELL ⁷⁶	10/10	IC	SC mobilisées par G-CSF	6	Amélioration FEVG et de la perfusion, augmentation de la resténose
MAGIC CELL-3-DES ⁷⁷	25/25	IC	SC mobilisées par G-CSF	6	Amélioration FEVG et diminution du remodelage
n =30 IC : intra-coronaire, CMMO : cellules mononuclées de la moelle osseuse, CPC : cellules progénitrices circulantes. * CMMO, n = 29 et CPC					

Tableau 2 : Etudes cliniques randomisées ou non chez des patients présentant une ischémie cardiaque chronique.

	N Traités/Contrôles	Voie d'administration	Type cellulaire	Suivi (mois)	Résultats
<i>Etudes non randomisées</i>					
Stamm et al. ⁷⁸	6/0	IM	CD133 ⁺ MO	3-9	Sans danger (faible amélioration FEVG)
Perin et al. ⁷⁹	14/0	EM	CMMO	12	Sans danger (faible amélioration FEVG et de la perfusion)
Tse et al. ⁸⁰	8/0	EM	CMMO	3	Sans danger (faible amélioration FEVG et de la perfusion)
Li et al. ⁸¹	6/0	IM	CMMO	6	Sans danger
Galinanes et al. ⁸²	14/0	IM	CMMO	10	Sans danger (faible amélioration FEVG et de la fonction régionale)
Katritsis et al. ⁸³	11/0	IC	CSM + PE		Sans danger (faible amélioration de la fonction régionale)
Ozbaran et al. ⁸⁴	6/0	IM	SC mobilisées par G-CSF	4	Sans danger (faible amélioration)
Boyle et al. ⁸⁵	5/0	IC	CD34 ⁺ mobilisées par G-CSF	12	Sans danger (faible amélioration)
Pompilio et al. ⁸⁶	4/0	IM	CD133 ⁺ mobilisées par G-CSF	4	Sans danger
Fuchs et al. ⁸⁷	27/0	EM	CMO non sélectionnées	12	Sans danger (faible amélioration de l'ischémie à 3 mois et des symptômes à 12 mois)
IACT ⁸⁸	18/0	IC	CMMO	3	Sans danger (faible amélioration FEVG et diminution taille infarctus)
<i>Etudes randomisées</i>					
Erbs et al. ⁸⁹	13/13	IC	SC mobilisées par G-CSF	3	Sans danger (faible amélioration FEVG et diminution taille infarctus)
MAGIC CELL-3-DES ⁷⁷	16/16	IC	SC mobilisées par G-CSF	6	Pas amélioration FEVG
TOPCARE-CHD ⁶³	52*/23	IC	CMMO/ CPC	3	Amélioration FEVG et de la fonction régionale
* CMMO, n = 29 et CPC, n =30 IC : intra-corrinaire, IM : intra-myocardique, EM : transendomyocardique, CMMO : cellules mononuclées de la moelle osseuse, CPC : cellules progénitrices circulantes					

4. Mobilisation des cellules souches de la moelle osseuse

L'intérêt porté à la mobilisation des CS a commencé dans les années 60, suite à la publication d'articles décrivant la présence de CSH dans le SP de souris, chiens, singes mais également chez l'humain. Durant le développement fœtal murin, les CSH sont initialement localisées dans la région du mésonéphros aorto-gonadique et dans le sac vitellin avant même la mise en place complète du système vasculaire. Pendant les dernières phases du développement embryonnaire, aussi bien chez la souris que chez l'homme, les cellules souches migrent du foie fœtal et vont peupler la moelle osseuse⁹⁰. Chez les individus adultes, la moelle osseuse constitue un réservoir pour une variété de cellules souches et progénitrices qui sont capables, après transplantation, de régénérer divers tissus. Dans les conditions physiologiques, la majorité des CSH, CSM et PE résident dans la moelle osseuse (MO) et de rares CSH⁹¹ et PE⁹² circulent dans le SP. Les CSM circulantes sont, quant à elles, difficiles à détecter⁹³. A la suite d'un stress ou d'une stimulation, tels qu'une lésion ou un phénomène inflammatoire, une petite fraction des CS sort de la MO et se retrouve en circulation dans le SP. Ce phénomène est appelé « mobilisation ». Les cellules mobilisées peuvent alors être collectées par aphérèse, concentrées et éventuellement enrichies avant d'être conservées dans le but d'une transplantation éventuelle. Les mécanismes moléculaires associés à la mobilisation des CS étaient, jusqu'il y a peu, méconnus. C'est pourquoi, des analyses systématiques des interactions moléculaires responsables de la rétention des CS dans leurs niches spécifiques de la MO, ainsi que des modifications pouvant conduire à la libération de ces cellules ont été menées.

4.1. Les niches de la moelle osseuse

Pour mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la mobilisation des CS de la MO vers le SP, il est important de comprendre l'organisation de la MO dans les conditions basales. Les CSH primitives sont localisées à l'interface entre l'os et la moelle, c'est-à-dire dans la région de l'endostéum en contact avec les ostéoblastes. Les cellules progénitrices déjà engagées dans une voie de différenciation se distribuent, quant à elles, au centre de la moelle. Une niche de cellules progénitrices endothéliales (exprimant le CD31, CD106, CD150, « platelet endothelial cell adhesion molecules-1 » (PECAM-1), P-selectine et E-selectine) est localisée en contact direct avec les nombreux sinus endothéliaux irrigant la MO. Ces différences de distribution entre les cellules souches et progénitrices sont à l'origine du

concept de niches, dans lesquelles des signaux spécifiques sont adaptés aux besoins de chaque type de cellules. En effet, afin de maintenir un nombre adéquat de cellules sanguines matures, la survie, la quiescence et la différenciation des cellules de chaque niche sont régulées pour maintenir un stock de cellules souches et de cellules progénitrices. Les interactions avec le stroma médullaire et les CSM contribuent également au développement de ces microenvironnements particuliers. D'autre part, les concentrations locales en calcium sont également importantes. L'os étant en perpétuel remodelage, un gradient de calcium apparaît à partir de l'endostéum, exerçant un rôle chimotactique⁹⁴. Des taux plus élevés de SDF-1 sécrété par les ostéoclastes sont également observés dans cette région. Nous verrons dans un paragraphe ultérieur le rôle de ce facteur.

4.2. Caractéristiques des cellules souches mobilisées

Le rôle physiologique de ces cellules progénitrices quiescentes, non cyclantes et circulantes, leur taux de renouvellement, leurs destination et destin ne sont pas connus. Certaines hypothèses ont été émises, suggérant que les CS circulantes pourraient migrer et reconstituer les zones endommagées de la moelle osseuse, ou encore, repeupler le thymus. Une autre possibilité serait que ces CS dans le SP ne possèdent pas un rôle physiologique mais seraient le reflet d'une fuite des cellules de la moelle. Enfin, il pourrait s'agir d'une voie de régulation de l'apoptose pour maintenir un nombre constant de CS dans les niches de la MO. En effet, les cellules CD34⁺ isolées dans les progéniteurs mobilisés possèdent des taux plus élevés de gènes pro-apoptotiques caspases 3, 4 et 8 et un niveau réduit d'inhibiteurs de l'apoptose, tel que l'antiprotéinase, par rapport aux cellules CD34⁺ de la MO⁹⁵. De plus, ces cellules présentes dans la circulation sont capables de retourner rapidement dans la MO, ce qui pourrait également indiquer un processus d'homéostasie.

Un pourcentage plus important des CSH mobilisées par rapport à leurs homologues résidant dans la MO est constitué de cellules non cyclantes. Le contrôle du cycle cellulaire semble tenir un rôle important dans les mécanismes induisant la mobilisation. En effet, seules les cellules rentrées en cycle et ayant dépassé la phase M semblent aptes à s'extravaser en périphérie⁹⁶. Le potentiel de prolifération et de différenciation est inférieur pour les CSH mobilisées par rapport à celles présentes dans la moelle et un nombre supérieur de cellules mobilisées est nécessaire pour repeupler la moelle osseuse de souris irradiées.

D'autre part, l'expression de l'intégrine VLA-4 (very late antigen-4), du récepteur cytokinique c-kit et du récepteur au SDF-1 CXCR4 est réduite sur les cellules progénitrices

mobilisées, alors que le taux des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 nécessaires pour la dégradation de la matrice extracellulaire et pour la migration transendothéliale est augmenté. Ces modifications sont sans doute à l'origine de leur capacité de repeuplement de la MO réduite par rapport aux cellules obtenues par ponction de moelle⁹⁰.

4.3. Facteurs induisant la mobilisation des cellules souches

La mobilisation des CS apparaît à la suite d'une variété de stimuli très divers. Par exemple, un exercice physique intense induit l'élévation des CSH dans le sang de coureurs de marathon⁹⁷. Dans les modèles animaux, cette élévation de CS dans le SP peut être induite cliniquement ou expérimentalement par de nombreuses molécules : des cytokines (« granulocyte colony-stimulating factor » (G-CSF), « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF), interleukine (IL)-3, 7, 12, « stem cells factor » (SCF) et ligand de Flt-3), des chémokines (IL-8, Mip-1 α , agoniste de CXCR-2 (Gro β), antagoniste de CXCR-4 (AMD3100) et « stromal cell-derived factor-1 » (SDF-1)) et des agents de chimiothérapie (cyclophosphamide (Cy) et paclitaxel). Ces molécules présentent des différences quant à leur rapidité d'action, le type de cellules mobilisées et leur efficacité⁹⁸. La mobilisation de CS par des cytokines hématopoïétiques tels que le G-CSF ou d'autres facteurs de croissance ou anticorps anti-intégrine nécessite des injections journalières durant un nombre de jours variable afin d'obtenir une efficacité maximale. Au contraire, la mobilisation induite par des chémokines est rapide et à lieu généralement maximum 1 heure ou moins d'1 heure après l'administration⁹⁹. Cependant, certains patients et une minorité d'individus en bonne santé ne répondent pas à ce traitement et ne mobilisent pas leur CS en périphérie.

4.4. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) et son récepteur

Le G-CSF est une glycoprotéine de 25-KDa qui appartient à une famille de cytokines dont la structure cristalline présente 4 hélices α (Fig.6). Il est produit par une variété de tissus et d'organes, dont notamment l'endothélium, les macrophages et diverses cellules du système immunitaire et certainement par le cœur ischémié. Toutefois, la concentration de G-CSF sanguins chez des individus sains est très basse (<50 pg/ml) ou indétectable¹⁰⁰. En effet, sa production est souvent initiée par des stimuli de stress physiologique ou pathologique telles que les infections suite à la sécrétion de « tumor necrosis factor α » (TNF α), interleukine-1 et 17, interféron- γ et lipopolysaccharides (LPS)¹⁰¹. Le G-CSF est usuellement utilisé pour traiter

les neutropénies et lors de protocoles de transplantation de MO, selon une posologie de 5 à 15 µg/Kg pendant 5 à 10 jours, et peut être associé à d'autres molécules. Il stimule également la survie, la fonction, la prolifération et la différenciation des précurseurs des neutrophiles et des neutrophiles matures et présente des propriétés immunomodulatrices¹⁰².

Bien que le G-CSF soit l'agent induisant la mobilisation le moins toxique, il est toutefois responsable d'effets secondaires tels que nausées, vomissements, diarrhée, fièvre, douleurs osseuses et élévation réversible des phosphatases alcalines, lactate déshydrogénase, aspartate aminotransférase et acide urique. Plus rarement, d'autres conséquences plus sévères ont été rapportées telles que des ruptures spléniques ou des thromboses sans doute liées aux récepteurs du G-CSF présents sur les plaquettes. Il a été démontré que le G-CSF induit une augmentation de la taille de la rate, suivie d'un retour à la normale à l'arrêt du traitement¹⁰³.



Figure 6: Structure cristalline de 3 molécules de G-CSF humaines.

Le récepteur du G-CSF (CD114 ou G-CSFR) est un membre de la superfamille des récepteurs cytokiniques de classe I et subit une homodimérisation suite à la liaison du G-CSF. Il s'en suit une rapide phosphorylation et une activation des 4 JAK Kinases associées à sa région cytoplasmique, induisant le recrutement de nombreuses protéines et l'activation d'une cascade de signalisation¹⁰⁴ (Fig. 7). G-CSFR est exprimé par les neutrophiles et leurs précurseurs dont les cellules myéloïdes progénitrices et les cellules primitives hématopoïétiques¹⁰⁵. D'autre part, il est présent sur d'autres types de cellules, telles que les cellules endothéliales humaines¹⁰⁶, les cellules du cordon ombilical et de l'artère coronaire, les cellules du placenta¹⁰⁷, les neurones du système nerveux central¹⁰⁸, les lymphocytes T activés, plusieurs types de tumeurs non hématologiques¹⁰⁹, mais aussi sur les cardiomyocytes

de souris et de rats adultes¹¹⁰; par contre, il n'a pas encore été mis en évidence dans le cœur humain.

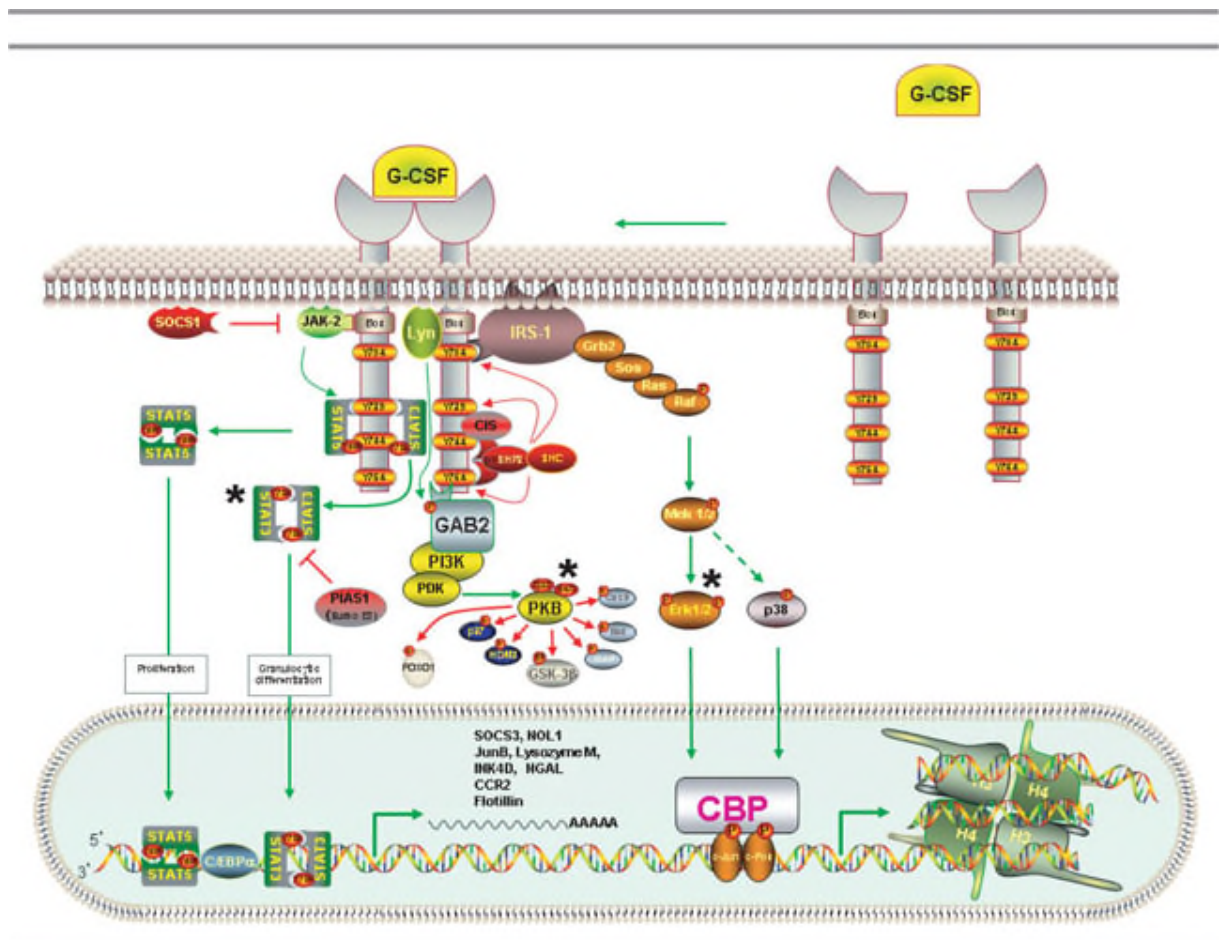


Figure 7 : Les principales voies de signalisation liées au récepteur du G-CSF. Les 3 voies (activation de STAT3, PKB et ERK1/2) qui ont été associées à la protection tissulaire cardiaque sont marquées d'un astérisque. Kurdi M. (Le Jacq 2007).

4.5. Avantages de la collecte de cellules souches mobilisées en périphérie

Depuis le milieu des années 1980, la mobilisation des CS de la MO est devenue une source possible pour les transplantations autologues et allogéniques de CSH; depuis les années 90, elle est maintenant la plus fréquente. En effet, lorsqu'une quantité suffisante de cellules peut être mobilisée, ce traitement offre l'avantage d'un coût moindre, associé une procédure de collecte sécurisée de CS. De plus, au-delà d'un plus grand confort et de plus de sécurité pour le donneur, les CS mobilisées montrent une reconstitution hématopoïétique (neutrophiles et plaquettes) plus rapide que celle obtenue par aspiration de la moelle et sont associées à une meilleure survie sans infection des receveurs¹¹¹. Malgré une augmentation de

10 à 50 fois du nombre des lymphocytes T mobilisés en périphérie, l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (« graft-versus-host disease », GVHD) aiguë est identique quelle que soit la source de CS mais les cas de GVHD chroniques sont cependant plus fréquents avec le SP mobilisé. L'administration de G-CSF est associée à une polarisation des lymphocytes T vers un phénotype TH2. En effet, le G-CSF agit sur les plasmocytes, les cellules dendritiques et les monocytes circulants, induisant notamment une augmentation de la sécrétion de l'IL-10 pouvant expliquer des taux de GVHD aiguë comparables aux greffes de MO.

4.6. Mécanismes cellulaires et moléculaires

Le développement de modèles d'animaux génétiquement modifiés a permis de faire la lumière sur certains scénarii impliqués dans le phénomène de mobilisation. Une des expériences la plus intéressante a été réalisée chez des souris déficientes pour le **récepteur du G-CSF**. Elle a montré que ce récepteur n'est pas nécessaire à la mobilisation, bien que l'augmentation des GB dans le SP soit fortement limitée après un traitement par du G-CSF mais aussi par de la cyclophosphamide ou de l'interleukine-8. La mobilisation est maintenue lorsque ces souris déficientes sont traitées par le ligand de FLT-3¹¹². Le G-CSF semble donc agir par des voies moléculaires secondaires.

L'intégrine **VLA-4** joue un rôle critique dans la mobilisation des CS. En effet, un anticorps anti-VLA-4 induit la mobilisation de progéniteurs, aussi bien chez la souris que chez les primates¹¹³. Chez des souris traitées par du G-CSF, les neutrophiles de la MO libèrent des taux plus élevés des 2 enzymes protéolytiques, élastase et cathepsin G, au moment de la migration des CS dans la circulation. Ces enzymes clivent les molécules de **VCAM-1** exprimées à la surface des cellules stromales ce qui limite la liaison de son ligand (l'antigène VLA-4 présent à la surface des cellules hématopoïétiques)¹¹⁴.

L'expression du **CXCR4** est très faible sur les cellules humaines CD34⁺ mobilisées et est associée à une migration limitée au travers d'un gradient de **SDF-1** (aussi appelé CXCL-12). Par contre, 40 à 50% des cellules CD34⁺ fraîchement isolées de moelle humaine expriment à leur surface le CXCR4 et 25% de ces cellules migrent suivant un gradient de SDF-1¹¹⁵. Ces données suggèrent l'importance de l'interaction SDF-1/CXCR4 au cours de la mobilisation des cellules immatures CD34⁺¹¹⁶. D'autre part, une corrélation a été établie entre de faibles expressions du SDF-1 et CXCR4 en périphérie et de hauts taux de mobilisation de

cellules CD34+ chez des patients traités par de la cyclophosphamide et du G-CSF. Cependant, le rôle direct des interactions SDF-1/CXCR4 dans les phénomènes de mobilisation induits par G-CSF reste incertain¹¹⁷. Des résultats intéressants ont néanmoins démontré que, lors de l'administration de G-CSF, l'élastase et la cathepsine G clivent non seulement VCAM-1 mais inactivent et dégradent également SDF-1 de la moelle murine et humaine, et cela est accompagné d'une augmentation de l'expression de CXCR4 sur les cellules de la moelle. De plus, des anticorps anti-CXCR4 et SDF-1 inhibent la mobilisation des CS. L'inhibition de l'**élastase** des neutrophiles, quant à elle, prévient la mobilisation des progéniteurs par le G-CSF, soulignant le rôle essentiel de l'élastase dans la mobilisation¹¹⁸. En effet, deux mutations génétiques de l'élastase induisant des formes défectives de cette protéine sont la cause de neutropénies sévères infantiles congénitales, suggérant l'importance des dégradations des molécules d'adhésions et du SDF-1 par l'élastase dans les processus homéostatiques de libération des cellules hématopoïétiques indifférenciées en périphérie. Une oscillation du taux de SDF-1 est en fait observée, au cours des phénomènes de mobilisation : une augmentation modérée est tout d'abord observée, suivie d'une diminution importante. Le CD26, molécule protéolytique exprimée par les CD34+ humains, dégrade également le SDF-1. Pour mieux déterminer le rôle *in vivo* du SDF-1 et du CXCR4, des expériences de homing et de repeuplement de souris SCID (« severe combined immunodeficiency ») par des cellules humaines ont été réalisées. Ces expérimentations sont possibles grâce au fait que la séquence en acides aminés du SDF-1 humain et murin ne diffère que par un seul acide aminé, induisant une cross-réactivité inter-espèce. Les interactions SDF-1/CXCR4 régulent indiscutablement le homing et le repeuplement de la moelle murine par des CS isolées de la moelle osseuse, du sang de cordon ombilical ou encore de CD34+ mobilisées, et ce, via l'activation du VLA-4 et 5¹¹⁹. L'ensemble de ces données expérimentales suggère qu'une régulation et un contrôle précis de la voie SDF-1/CXCR4 pourraient améliorer le devenir clinique de la mobilisation de cellules souches pour la transplantation.

Les interactions ostéoclastes/ostéoblastes sont étroitement liées aux remodelages du tissu osseux et le nombre d'ostéoclastes est fortement augmenté suite aux stimulations induites par le G-CSF, provoquant une libération de calcium pouvant modifier l'attachement des cellules progénitrices. Les ostéoclastes sécrètent de grandes quantités d'**IL-8**¹²⁰, une chémokine induisant la mobilisation, mais également de hauts niveaux de métalloprotéinase **MMP-9** en réponse au SDF-1¹²¹, qui participent à la mobilisation médiée par le G-CSF. L'activation de **MMP-2** et MMP-9 est une étape fondamentale pour la mobilité des CS. En

effet, le traitement de souris par un inhibiteur des MMP prévient aussi bien la mobilisation que le homing dans la MO. De plus, MMP-9 est impliquée dans la libération de la cytokine membranaire SCF de la MO dans le SP, ce qui constitue une étape importante pour la mobilisation induite par le G-CSF via SDF-1¹²². Remarquons toutefois qu'il ne s'agit pas d'un effet direct du G-CSF sur les ostéoclastes, ces derniers ne possédant pas le récepteur au G-CSF.

En résumé, la MO est un réservoir de cellules matures et progénitrices qui peuvent être libérées dans le SP suite à un stress. Lorsque l'équilibre dynamique de la MO est perturbé, il s'en suit une augmentation transitoire du SDF-1, une prolifération ainsi qu'une activation des neutrophiles et des ostéoclastes. La libération d'enzymes protéolytiques a pour conséquence la libération du SCF membranaire, la rupture de la liaison VCAM-1/VLA-4, la prolifération des CS, l'augmentation de l'expression du CXCR4 et l'inactivation du SDF-1. Cette modification de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion de la moelle osseuse aboutit à la libération des progéniteurs dans la circulation (Fig. 8). Le G-CSF semble donc capable de mobiliser des cellules qui se caractérisent par l'expression du CXCR4, incluant les CSH, les PE et les CSM¹²³.

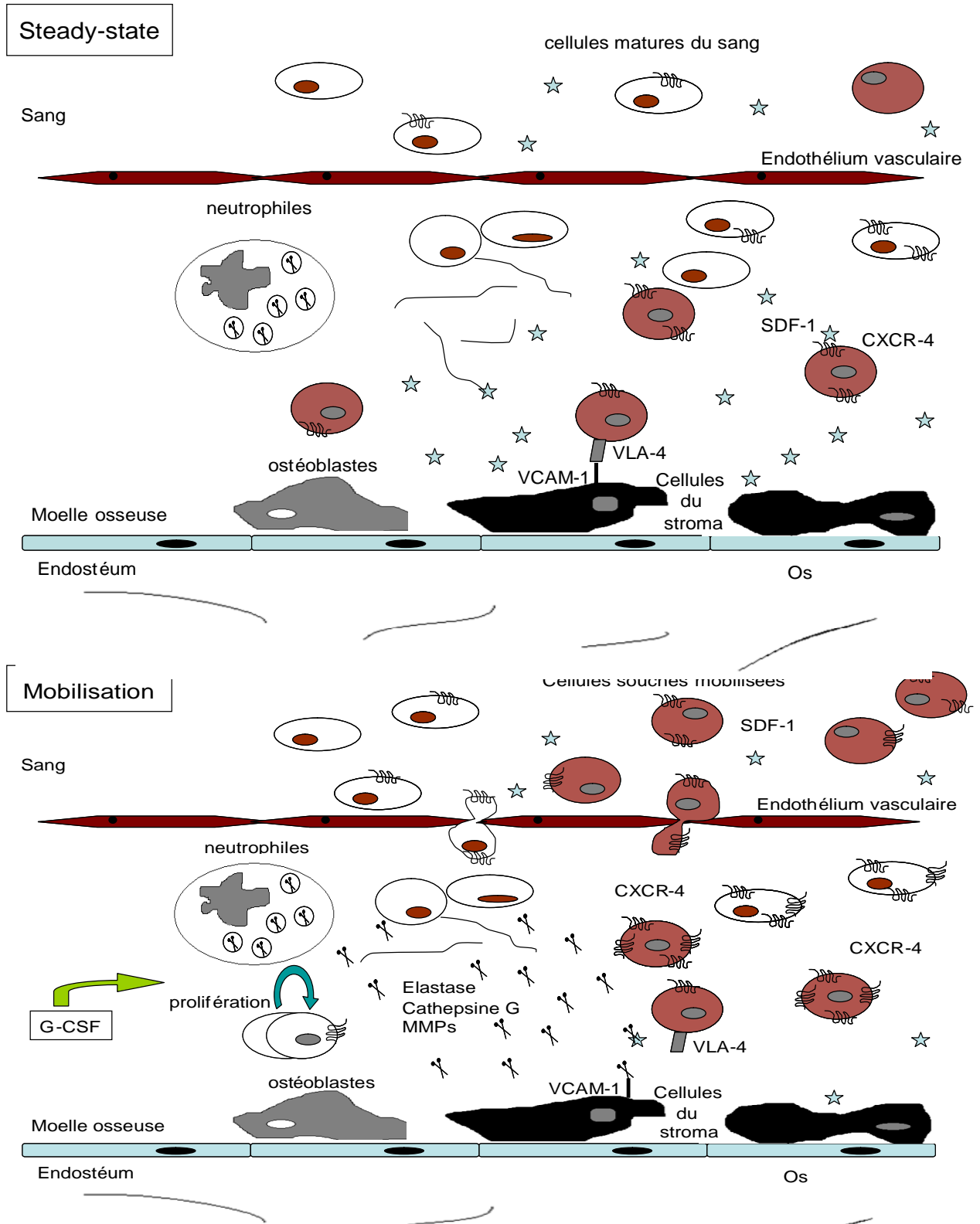


Figure 8 : Schématisation de la mobilisation des cellules souches par du G-CSF. L'image supérieure représente l'état basal dans lequel les cellules souches sont localisées à proximité des cellules stromales. La rétention des cellules dans la moelle osseuse est médiée par les interactions VCAM-1/VLA-4 et SDF-1/CXCR4. L'image du dessous montre les modifications induites par le G-CSF au cours de la mobilisation. Le G-CSF induit la prolifération des cellules et la libération des protéases des neutrophiles (élastase, cathepsine G et MMPs) qui participent à la migration des cellules par la dégradation des molécules d'adhésion (VCAM-1 et SDF-1) et en remodelant la matrice extracellulaire. L'«uprégulation» du CXCR4 sur les cellules de la moelle osseuse suggère une participation active de la voie de signalisation SDF-1/CXCR-4 dans la migration des cellules dans le sang périphérique. Adapté de la figure de Lapidot T. (Exp. Hematol. 2002).

5. G-CSF et les infarctus aigus du myocarde

Les avancées thérapeutiques réalisées en cardiologie ont permis d'améliorer la survie des patients souffrant d'infarctus aigu du myocarde (IM). La prise en charge rapide de ces patients et les traitements par thrombolyse et dilatation des artères par coronarographie ont fortement diminué la mortalité liée à cette pathologie, conduisant à une augmentation importante du nombre de patients souffrant de pathologie cardiaque chronique. C'est pourquoi, récemment, l'intérêt pour les avancées en régénération tissulaire a augmenté et s'est en outre concentré sur la thérapie cellulaire et génique. La mise en évidence d'un chromosome Y dans le cœur d'une femme greffé à un receveur masculin¹²⁴, ainsi que la détection de ce chromosome dans les cardiomyocytes de patientes ayant reçu une transplantation de moelle de donneurs masculins¹²⁵, a attiré l'attention sur la mobilisation des CS de la MO vers le cœur. Rezai et al. ont récemment démontré que pré-traiter par du G-CSF le donneur et le receveur d'une greffe de cœur chez la souris améliore l'allogreffe, notamment en augmentant le nombre de cellules progénitrices de l'hôte disponibles pour la reconstitution des vaisseaux sanguins¹²⁶ et ce, même en présence d'immunosuppresseurs. Plusieurs études ont plus particulièrement montré les effets bénéfiques du G-CSF pour prévenir les dysfonctions et le remodelage ventriculaire dans divers modèles animaux. Différentes théories sont proposées pour expliquer cette évolution favorable suite au traitement par du G-CSF, notamment, par une action directe sur le tissu cardiaque, ou encore, par le recrutement et la différenciation de CS provenant du SP. Des études cliniques randomisées ont publié récemment des résultats plus mitigés et, bien que l'utilisation du G-CSF apparaisse comme une voie attractive pour la thérapie tissulaire cardiaque, une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ce facteur de croissance doit être obtenue et des études animales rigoureuses complémentaires doivent être menées.

5.1. Effets protecteurs directs du G-CSF sur les cardiomyocytes

Au-delà de la mobilisation des CS dans le SP qui peuvent alors migrer dans le tissu cardiaque, des découvertes de plus en plus nombreuses suggèrent un effet protecteur direct du G-CSF sur le cœur. En effet, les gènes généralement impliqués dans le homing des CS, tels que le SDF-1 et le SCF, ainsi que les gènes participant aux phénomènes d'angiogenèse, ne sont pas « uprégulés » dans le tissu cardiaque après un IM, alors que l'expression des gènes inflammatoires domine¹²⁷. Par exemple, le G-CSF pourrait induire un milieu plus

« hospitalier » pour la migration et la greffe des CS dans le myocarde lésé. De façon intéressante, Kuhlmann et al. ont démontré que l'expression du G-CSFR augmente les 1^{ères} semaines après l'IM, ce qui pourrait suggérer une sensibilisation possible du cœur aux effets directs du G-CSF pendant cette période¹²⁸. Le G-CSF active significativement et de façon dose-dépendante Janus kinase-2 (Jak2) dans les cardiomyocytes¹¹⁰. La production de protéines anti-apoptotiques en aval de l'activation de STAT3 a un effet protecteur direct sur les cardiomyocytes¹²⁹. De même, l'activation d'Akt et de la protéine kinase B limite la production de molécules qui ont des effets néfastes sur le remodelage cardiaque, tels que le récepteur de l'angiotensine II, le « transforming growth factor- β 1 » (TGF- β 1) et le TNF α ¹³⁰. Un modèle de cœur isolé a montré que le G-CSF diminue significativement la taille de l'infarctus après une privation de perfusion de 30 min, et par analyse western blot, que le taux de phosphorylation de Akt, Jak2 et Stat3 mesuré est nettement réduit en présence de ce facteur de croissance¹¹⁰. Li et al. ont également démontré un effet direct du G-CSF par réduction du nombre de cardiomyocytes en apoptose mais également par amélioration de la réendothélisation de l'artère carotide après une lésion¹³¹. Il a également été reporté que le G-CSF pouvait exercer un effet anti-inflammatoire en atténuant la libération de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , IL-1 β , IL-12 et les LPS¹³². De plus son effet angiogénique direct a été démontré par l'administration locale de G-CSF dans des cornées de lapins¹³³ ou dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rongeur¹⁰⁷. Enfin, une hypothèse serait que le G-CSF réduirait les arythmies survenant dans la zone ischémisée en augmentant l'expression de la connexine 43¹²⁸.

5.2. Régénération myocardique suite à la mobilisation de cellules souches

Bien que les effets directs protecteurs du G-CSF sur les cardiomyocytes semblent clairement établis et prédominants, Misao et al. démontrent néanmoins l'importance du recrutement des CS de la MO dans les phénomènes de réparation cardiaque médiés par le G-CSF¹³⁴. Ces cellules mobilisées peuvent non seulement contribuer à la restauration tissulaire, en se différenciant dans les différentes cellules qui composent le cœur, mais également par la sécrétion de cytokines. La diminution de la taille de la zone cicatricielle, ainsi que l'amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche et du remodelage ventriculaire, obtenues après 3 à 7 jours de traitement par du G-CSF, sont bloquées par l'AMD3100 (antagoniste du CXCR4, voir paragraphe 2.3.) sans cependant affecter l'up-régulation du SDF-1 ou l'activation de STAT3. Les CSH sont mobilisées après un infarctus¹³⁵ et migrent

dans le cœur lésé; malheureusement elles ne semblent pas s'intégrer et disparaissent rapidement¹³⁶. De plus, leur potentiel à se différencier en cardiomyocytes *in vitro* n'a pas pu être démontré. Cependant, les CSH se différencient *in vivo* en cellules endothéliales du muscle lisse^{137,138}. Et, bien qu'un effet positif des CSH sur le tissu cardiaque soit décrit, les hypothèses de fusion cellulaire ou d'effets paracrines positifs des CSH sur les cardiomyocytes endogènes semblent prévaloir^{104,139,140}.

L'augmentation du nombre de cellules endothéliales circulantes est un facteur prédictif d'incidents cardiovasculaires majeurs, soulignant le rôle crucial des dommages de l'endothélium dans la physiopathologie des syndromes coronaires aigus¹⁴¹. D'autre part, les cellules progénitrices endothéliales présentes dans le SP sont réduites chez les patients présentant une pathologie cardiovasculaire chronique telle qu'une atteinte des artères coronaires ou, chez ceux qui présentent des facteurs de risque de maladies cardiaques. Cependant, ces progéniteurs sont fortement mobilisés en cas de lésions vasculaires tels que les IM¹³⁵ ou après une opération cardiaque et ce, de façon proportionnelle au niveau de G-CSF endogène produit^{142,143}. Ces cellules migrent alors dans le site lésé et forment de nouveaux vaisseaux sanguins (vasculogénèse)¹⁴⁴ ou permettent le développement de vaisseaux préexistants par sécrétion de facteurs de croissance (angiogénèse)^{145,146}. Deindl et al. ont montré que l'administration du G-CSF après un IM recrute dans le site ischémié des CS, stimule l'angiogénèse et augmente l'expression de ICAM-1 sur les cellules endothéliales¹⁴⁷ (Fig.9). Cependant, l'impact des PE en réparation tissulaire est certainement limité par le faible nombre de cellules présentes dans le SP, qui est encore réduit chez les personnes âgées ou souffrant d'artériosclérose, ainsi que par un mécanisme de homing déficient décrit pour les PE de patients souffrant de maladies cardiovasculaires^{148,149}. Afin de développer leur utilisation thérapeutique, il faudrait augmenter le nombre de cellules mobilisées ou améliorer leur homing et leur survie dans les tissus endommagés.

Plusieurs études ont montré que la concentration en CSM fluctue en parallèle à l'évolution de la pathologie, dans le sang des patients présentant un IM¹⁵⁰ et que ces cellules peuvent migrer dans le cœur infarci et y exercer un effet positif sur la fonction cardiaque¹⁵¹. Cependant, bien que l'on ait vu dans un paragraphe précédent que ces CSM se différencient en cellules cardiaques *in vitro*, leur transdifférenciation *in vivo* est lente et le mécanisme de fusion cellulaire ne peut pas être exclu. De plus, leur intégration dans le tissu cardiaque diminue avec le temps. Néanmoins, les CSM semblent stimuler la néovascularisation dans le cœur grâce à des facteurs paracrines¹⁵². Enfin, une autre hypothèse soulevée par Mazhari

suggère que les CSM seraient capables de recréer l'environnement cardiaque nécessaire permettant aux cellules progénitrices cardiaques de proliférer à nouveau¹⁵³.

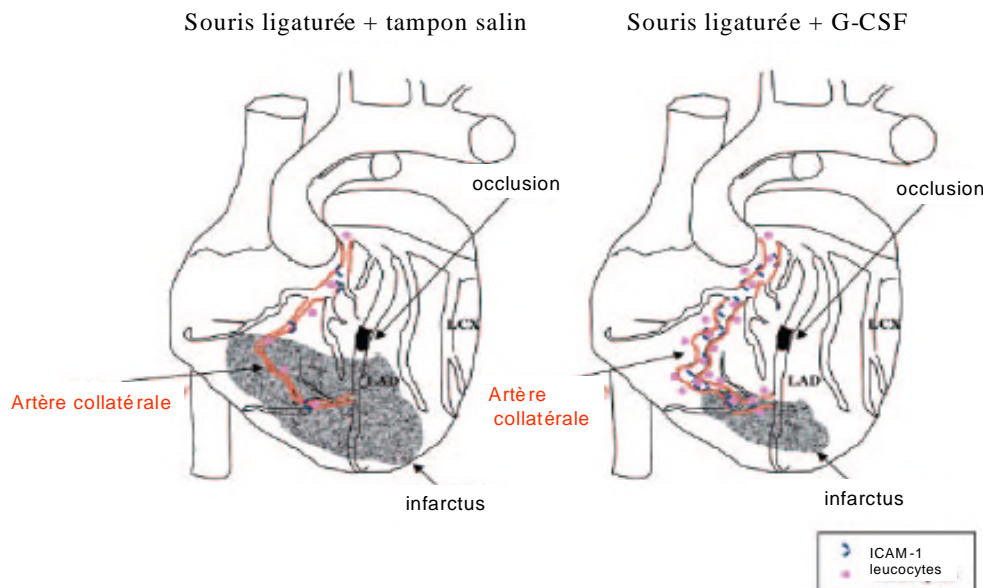


Figure 9 : Mécanisme d'action du G-CSF proposé par Deindl et al.. L'administration du G-CSF induit un phénomène d'artériogénèse par la mobilisation de leucocytes et l'« up-régulation » d'ICAM-1, ce qui permet un meilleur apport sanguin dans la région ischémisée. Les effets positifs qui s'en suivent sont la réduction de la taille de l'infarctus associée à une amélioration de la fonction cardiaque. Adapté de la figure de Deindl E. (FASEB Journal 2006).

La mobilisation des CS de la MO et, plus particulièrement, des PE, peut être améliorée ou altérée par de nombreux facteurs dont les principaux sont l'âge et les facteurs de risques cardiovasculaires. La qualité et la quantité des CS mobilisées par le G-CSF chez certains patients peuvent donc ne pas être suffisantes pour induire un impact positif sur le cœur. Cela peut être amélioré par l'effet synergique de certains agents avec le G-CSF¹⁰⁴. Par exemple, l'administration de l'AMD3100 résulte en une mobilisation rapide, après quelques heures seulement, alors que la réponse au G-CSF est plus lente (quelques jours). Cependant, l'AMD3100 semblerait bloquer le homing, comme décrit précédemment, et ne constitue donc pas une solution immédiate. Les alternatives à l'AMD3100 sont l'agoniste α du récepteur de l'acide rétinoïque (VTP195183), les agents myélosuppresseurs comme la cyclophosphamide et le 5-fluorouracil, et le flt3 ligant (FL). VTP195183 augmenterait le nombre de neutrophiles de la MO, aidant le G-CSF à libérer des protéases qui digèrent la matrice retenant les CS¹⁵⁴. Le recrutement des CS dans le cœur est amélioré par l'administration simultanée de G-CSF et de molécules myélosuppresseurs. Cependant, l'usage en clinique semble impossible, étant donné que des effets cardiotoxiques ont été décrits pour ces molécules¹⁵⁵. L'association du G-CSF et du FL améliore davantage les performances du ventricule gauche que le G-CSF seul

mais augmente aussi l'expression des molécules d'adhésion CD62L et CD11a sur les CS mobilisées, ce qui facilite leur homing dans le cœur^{156,157}.

D'autre part, comme nous l'avons exposé précédemment, la voie de signalisation SDF-1 et CXCR4 joue un rôle important dans la mobilisation des CS. C'est pourquoi il est intéressant de noter que l'expression du SDF-1 dans le myocarde ischémié est augmenté directement après IM aigu et revient à l'état basal après 7 jours¹⁵⁸. En effet, l'hypoxie est un des régulateurs de la voie de signalisation CXCR4/SDF-1 car elle induit l'augmentation du CXCR4 par les cellules progénitrices¹⁵⁹ et du SDF-1 par les tissus ischémiés¹⁶⁰. Dans les conditions physiologiques, le microenvironnement de la MO est légèrement hypoxique et assure l'attachement des cellules progénitrices¹⁶¹. Des molécules d'adhésion telles que la P-sélectine ou l'intégrine VLA-4 interviennent dans le homing des cellules présentes dans le SP, en assurant les étapes de « rolling » et d'adhésion à la paroi des vaisseaux sanguins qui précèdent leur extravasation dans les tissus. Le homing des CS dans le tissu cardiaque semble être l'image en miroir de la mobilisation de ces cellules à partir de la MO ; en effet, la régulation de ces deux phénomènes présente de nombreuses similitudes. Alors que le recrutement et le homing des CS dans le cœur sont des facteurs limitant en thérapie cellulaire, la surexpression de SDF-1 est suffisante pour augmenter le nombre de cellules qui migrent dans le myocarde ischémié après avoir été mobilisées par du G-CSF¹⁵⁸.

Pour résumer, les différents mécanismes d'action du G-CSF sur le cœur après infarctus sont repris figure 10.

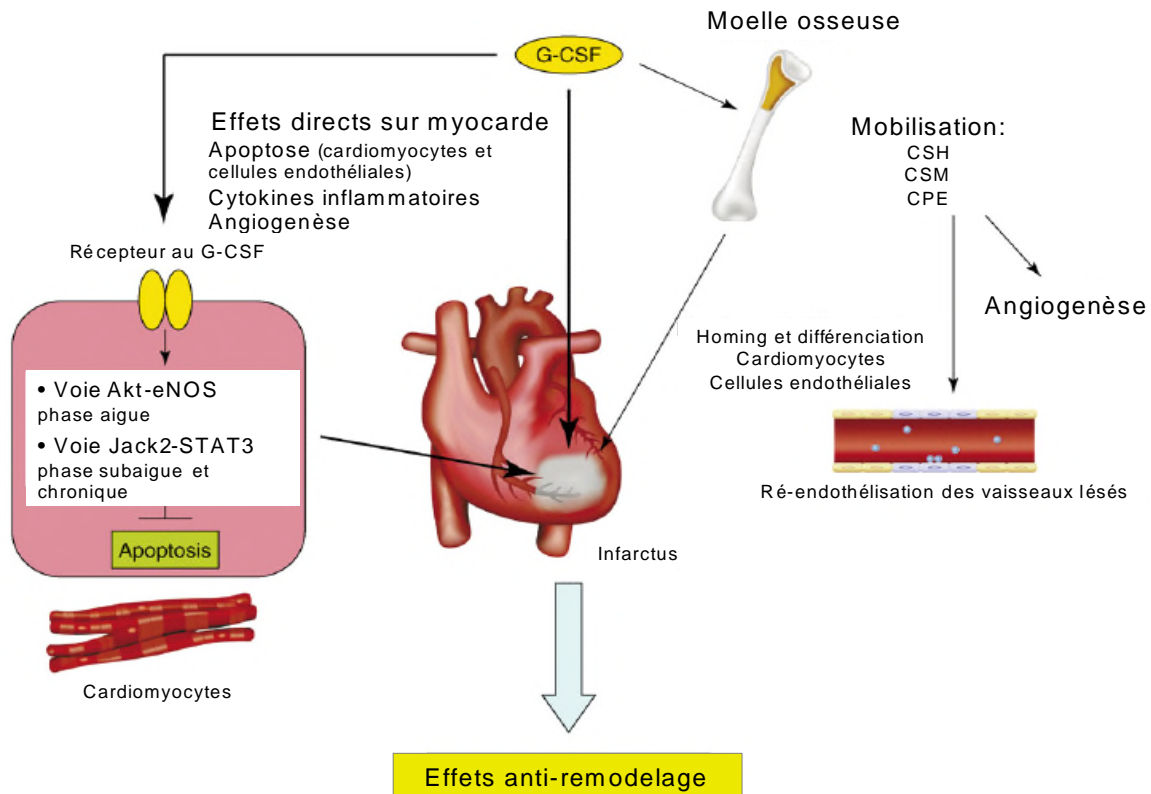


Figure 10 : Schéma hypothétique reprenant les différents mécanismes cardioprotecteurs du G-CSF. Les voies les plus importantes sont symbolisées par des flèches en gras. Adapté de la figure de Takano H. (TRENDS in pharmacological Sciences 2007).

5.3. Modèles animaux et études cliniques

Orlic et al. ont évalué l'impact de la mobilisation des CS de la MO par des cytokines sur le myocarde ischémié dans un modèle murin d'IM. Les animaux étaient injectés pendant 5 jours avec du SC de rat et du G-CSF humain, subissaient la ligature de leur artère coronaire gauche puis recevaient les cytokines pendant 3 jours supplémentaires. Cette méthode réduit considérablement la mortalité des souris et améliore significativement leur fonction cardiaque. Un mois après l'IM, des cardiomyocytes en division et des structures vasculaires en formation peuvent être observés¹⁶². La mobilisation par des cytokines des CS de la MO améliore la fonction cardiaque et le pronostic après un IM. L'intérêt d'un traitement par du G-CSF, administré uniquement après apparition de l'infarctus, a également été évalué et des effets positifs ont également été observés, notamment grâce à la formation de vaisseaux sanguins¹⁶³. Minatoguchi et al. ont pu mettre en évidence que le G-CSF prévient le remodelage et la dysfonction cardiaque après 3 mois dans un modèle d'ischémie suivie d'un reperfusion chez le lapin. Cet effet positif est lié à une augmentation du nombre de macrophages 2 jours après l'IM et à une expression plus importante de MMP-1 et 9 après 7

jours¹⁶⁴. Dans un modèle chez le rat ligaturé, une expression plus soutenue de l'ARNm du TGF- β et du pro-collagène de type I et III est observée chez les animaux injectés avec du G-CSF et est associée à des cicatrisation et régénération cardiaque plus rapides¹⁶⁵. Au travers d'un modèle similaire, un traitement par du G-CSF et du SCF a amélioré les réserves fonctionnelles du VG, sans cependant avoir d'impact sur le tissu cicatriciel¹⁶⁶. Kawada et al. ont pu mettre en évidence des CSM différenciées en cardiomyocytes, après mobilisation par du G-CSF chez la souris souffrant d'IM¹⁶⁷. Toutefois, Brunner et al. ont montré que, malgré une augmentation des cellules progénitrices dans le SP de souris mobilisées par du G-CSF, ces cellules ne migraient pas dans le tissu cardiaque mais que par contre, le nombre de cellules progénitrices cardiaques Sca-1+ était significativement supérieur suite à ce traitement¹⁶⁸. Le G-CSF est également efficace chez les gros animaux pour prévenir le remodelage cardiaque et semble agir par la diminution du nombre de cellules en apoptose, l'augmentation de l'expression du VEGF et l'activation Akt¹⁶⁹. Cependant, de façon opposée à ces résultats, d'autres publications montrent qu'en présence¹⁷⁰ ou non¹⁷¹ d'un phénomène d'angiogenèse, il n'y a pas d'impact positif du G-CSF sur la restauration cardiaque dans les modèles d'IM. Toutefois, l'intérêt du G-CSF a également été évalué dans les protocoles de transplantation cardiaque. Higuchi et al. ont démontré qu'un pré-conditionnement par du G-CSF atténuait les lésions consécutives à la revascularisation lors de greffes de cœurs conservés de façon prolongée dans des conditions d'hypothermie. Ces effets positifs du G-CSF s'expliquent par une augmentation importante des capillaires cardiaques avant le prélèvement du cœur, mais aussi par une action anti-apoptotique au moment de la greffe, médiée via l'activation de Stat3¹⁷².

Basées sur ces données expérimentales obtenues au travers des modèles animaux, des études cliniques ont évalué la « faisabilité » et la sécurité d'un traitement adjuvant par du G-CSF chez des patients présentant un IM aigu et recevant un traitement standard (intervention coronaire percutanée et médication conventionnelle). Ces études montrent des résultats controversés quant à l'impact de ce traitement sur la fonction myocardique.

Suite au haut taux de resténose obtenu par le groupe de Kang lorsque ces patients étaient injectés pendant 4 jours avec du G-CSF (10 μ g/kg) et vu l'apparition d'effets secondaires sérieux chez des patients présentant une pathologie sévère de l'artère coronaire et recevant du G-CSF¹⁷³, la sécurité d'un tel traitement a été mise en doute. Pour éclaircir ce point, l'effet du G-CSF a été étudié dans un modèle de lésions vasculaires chez des rats. Le traitement par le G-CSF accélère la réendothélisation, en augmentant le nombre de PE et en diminuant

l'amincissement de la néointima. L'auteur conclut en suggérant que la mobilisation des cellules progénitrices avant les interventions d'angioplastie pourrait constituer une stratégie en vue de diminuer la resténose des vaisseaux lésés¹⁷⁴. L'impact d'un traitement par G-CSF après la pose d'un stent a été examiné au travers d'une seule étude chez l'animal. La re-endothélisation au niveau du stent est meilleure chez les animaux recevant du G-CSF que chez les animaux contrôles, ce qui pourrait limiter les thromboses précoces ou plus tardives liées au stent¹⁷⁵. D'autre part, le G-CSF diminue la sténose des artères coronaires et le nombre de plaques lipidiques de l'artère thoracique chez des lapins hyperlipémiques¹⁷⁶. De plus, une méta-analyse de l'ensemble des études cliniques randomisées réalisées n'a pas pu mettre en évidence une différence de resténose entre les patients traités ou non par du G-CSF¹⁷⁷. Ces observations suggèrent que le G-CSF peut être utilisé chez les patients qui présentent de l'athérosclérose.

Valgimili et al. ont analysé l'effet du G-CSF au travers d'une étude randomisée chez des patients ayant subi une intervention coronaire, avec la mise en place d'un stent. Bien que de façon non significative, la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est améliorée et le volume de fin de diastole (VDVG) est réduit chez les patients recevant du G-CSF par rapport au groupe contrôle après 6 mois de suivi¹⁷⁸. L'étude FIRSTLINE-AMI (« The Front Integrated Revascularisation and Stem cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction ») regroupe des patients présentant les mêmes caractéristiques et montre une amélioration significative de la FEVG tandis que le VDVG ne change pas chez les sujets recevant du G-CSF et augmente dans le groupe contrôle¹⁷⁹. L'étude GLEAM réalisée chez des patients qui présentent une occlusion totale de l'artère coronaire antérieure descendante, a mis en évidence une amélioration de la FEVG, sans différence du VDVG entre les patients traités ou non¹⁸⁰. Les études REVIVAL-2 (Regenerate Vital Myocardium by Vigorous Activation of Bone Marrow Stem Cells)¹⁸¹ et STEMMI (Stem Cells in Myocardial Infarction)^{182,183} ne rapportent aucune amélioration liée au traitement par le G-CSF mais n'observent pas non plus d'effets secondaires supplémentaires chez les patients injectés. Une sous-étude de REVIVAL-2 explique ces résultats par une diminution significative de l'expression du LFA-1 (« lymphocyte function-associated antigen-1 »), du VLA-4 et du CXCR-4 à la surface des cellules progénitrices mobilisées par le G-CSF, ce qui altérerait leur capacité de homing dans le cœur¹⁸⁴. Et enfin, l'étude G-CSF STEMI montre que la fonction myocardique globale n'est pas améliorée, malgré un nombre de progéniteurs endothéliaux plus élevé dans le SP et une perfusion du tissu cardiaque significativement améliorée dans le groupe recevant du G-CSF^{185,186}. L'âge des patients inclus dans ces études cliniques peut

significativement influencer la survenue des effets positifs liés au G-CSF. En effet, Lehrke et al. ont clairement démontré chez le rat que l'efficacité du G-CSF à atténuer le remodelage post-IM est fortement réduite avec l'âge. Toutefois, le nombre de cellules mobilisées dans le SP ou dans le cœur est identique chez les animaux jeunes ou vieux, mais, par contre, le taux d'apoptose des cardiomyocytes est beaucoup plus important dans le cœur des rats âgés¹⁸⁷. Le tableau 3 résume ces études cliniques randomisées et leurs principaux résultats. L'intervalle de temps entre la survenue du problème cardiaque ou la pose du stent et le début du traitement par G-CSF semble être un facteur affectant fortement les différences observées entre ces études. Il apparaît que l'administration précoce de G-CSF est cruciale pour obtenir des effets positifs, sans doute attribuables à une action directe de la cytokine sur le myocarde. De plus, le traitement par du G-CSF semble plus efficace chez les patients dont la fonction du VG est la plus altérée c'est-à-dire présentant une fraction d'éjection inférieure à 50%¹⁸⁸.

L'efficacité de ces nouvelles thérapies dépend de la rigueur des investigations fondamentales : c'est pourquoi les résultats obtenus au travers des modèles animaux et des études cliniques, ainsi que des lors recherches menées afin de déterminer les mécanismes d'action du G-CSF sont très importants. En effet, la dose de G-CSF à administrer, la durée du traitement ainsi que le moment auquel le traitement doit débuter ne sont pas encore établis.

Tableau 3 : Etudes cliniques randomisées, en double aveugle, placebo versus G-CSF, évaluant la thérapie par le G-CSF chez des patients souffrant d'infarctus du myocarde aigu.

	N Traités/Contrôles	G-CSF (dose X durée)	Intervalle moyen entre IM et traitement par G-CSF	Suivi (mois)	Méthode	Résultats
Ellis et al. ¹⁸⁹	12/6	5 ou 10 µg/Kg X 5 J	39 H	1	Echo	FEVG et VDVG inchangés
Valgimili et al. ¹⁷⁸	10/10	5 µg/Kg X 4 J	37 H	6	SPECT	FEVG et VDVG inchangés
FIRSTLINE-AMI ¹⁷⁹	25/25	10 µg/Kg X 6 J	6,5 H	4	Echo + IRM	FEVG ↑ et VDVG ↓
REVIVAL-2 ¹⁹⁰	56/58	10 µg/Kg X 5 J	5 jours	4 à 6	SPECT + IRM	FEVG et taille de l'infarctus inchangés
STEMMI ^{182,183}	39/39	10 µg/Kg X 6 J	33,5 H	6	IRM	FEVG et VDVG inchangés
G-CSF STEMI ¹⁸⁵	23/21	10 µg/Kg X 5 J	63 H	3	IRM	FEVG et VDVG inchangés
Reginera ¹⁹¹	14/27	10 µg/Kg X 5 J	5 jours	5	Echo	FEVG ↑ et VDVG ↓
Takano et al. ¹⁸⁰	18/22	2,5 µg KgX 5 J	24 H	6	SPECT	FEVG ↑ et VDVG inchangé
Leone et al. ¹⁹²	20/20	10 µg/Kg X 5 J	>5 jours	6	Echo	FEVG ↑ et VDVG ↓

Echo : Echocardiographie, SPECT : « Single photon emission computed tomography », IRM: Imagerie par résonance magnétique

6. Technique d'imagerie médicale chez le petit animal

La souris est l'espèce la plus étudiée en recherche biomédicale et son utilisation remonte à la fin du XIX^{ème} siècle. L'avènement des animaux génétiquement modifiés a d'autant plus accru l'intérêt porté aux modèles murins. Le génome murin étant très proche de l'humain, la majorité des gènes humains ont leur homologue chez la souris. De plus, le génome murin a été largement séquencé et, de ce fait, la localisation des gènes est connue. En ce qui concerne les études sur la fonction cardiaque, le modèle d'IM par ligature de l'artère coronaire est largement utilisé et a permis de démontrer que l'altération de la structure et de la fonction cardiaque après ligature de l'artère coronaire chez la souris est proche des changements physiopathologiques dans le cœur humain ischémié¹⁹³. Trois types d'animaux génétiquement modifiés sont également intéressants à utiliser dans l'étude des pathologies cardiaques: (1) des souris pour lesquelles un gène impliqué dans le développement ou la réparation cardiaque est délété ou surexprimé, (2) des animaux immunodéficients permettant la greffe de cellules humaines sans rejet et (3) des souris exprimant constitutivement le gène de la « green fluorescent protein » (GFP) permettant une détection aisée des cellules murines. Les techniques d'imagerie médicale chez le petit animal se développent en parallèle et permettent l'accès à la structure, la vascularisation et la fonction cardiaque fine chez la souris. Les techniques complémentaires, usuellement utilisées pour obtenir des mesures hémodynamiques, sont l'échocardiographie, le cathétérisme intraventriculaire et la résonance magnétique nucléaire. La technique de «Single photon emission computed tomography» (SPECT) permet une étude précise de la perfusion cardiaque. Dans l'évaluation de l'hémodynamique cardiaque fine de nos souris, nous avons utilisé ces techniques, à l'exception de la RMN.

6.1. Le cœur murin

Le cœur de la souris a une orientation verticale. Son poids varie entre 100 et 175 mg chez la souris adulte, suivant la taille et le sexe de l'animal. La taille du cœur, de la base à l'apex, est de ± 1 cm et sa largeur de ± 5 mm (Fig. 11). Comme chez l'homme, le cœur murin est constitué de 2 oreillettes et 2 ventricules, et les valves sont similaires à celles du cœur humain. L'apport sanguin au myocarde du VG est principalement dépendant de l'artère coronaire gauche antérieure qui bifurque en une branche antérieure et une latérale de tailles égales. Elles irriguent respectivement les parois antéro-septale et antéro-latérale du VG. Cette

artère se positionne de façon plus latérale et ne suit pas le sillon inter-ventriculaire comme dans le cas de l'artère coronaire gauche antérieure descendante¹⁹⁴. Le diamètre interne du VG est de ± 3 mm et l'épaisseur des parois de ± 1 mm. La fréquence cardiaque est de 500 à 600 pulsations par minute et le rythme respiratoire de 160 par minute. Le volume de sang est de 1,5ml chez une souris de 20g. L'examen du cœur de la souris se heurte à plusieurs difficultés d'acquisition des images, du fait de la taille de l'organe et de la fréquence cardiaque. De ce fait, l'utilisation d'appareils possédant une excellente résolution spatiale et des images de hautes fréquences est nécessaire. D'autre part, le choix de la sédation est crucial, de façon à obtenir des acquisitions dans une situation proche de l'état physiologique. La kétamine (50 mg/Kg en injection intrapéritonéale) est le plus souvent utilisée car elle permet une anesthésie acceptable de l'animal, avec une fonction cardiaque stable. L'utilisation de la xylazine doit être réfléchié puisqu'elle entraîne facilement bradycardie et hypotension, de même que l'usage du pentobarbital, qui diminue la contractilité du cœur et augmente les résistances vasculaires périphériques. L'avertine, quant à elle, induit des variations constantes des paramètres hémodynamiques et ne permet donc pas de réaliser les examens dans des conditions appropriées¹⁹⁵.

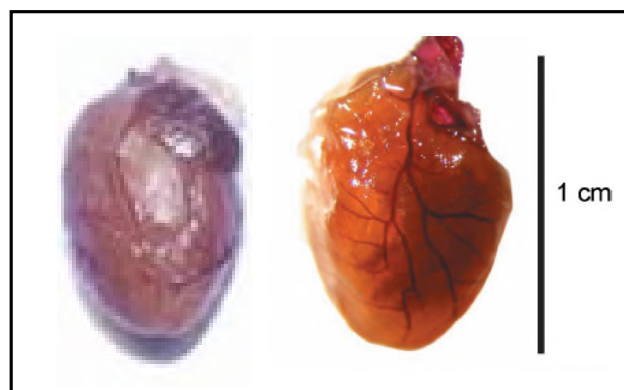


Figure 1: Photographies représentant des cœurs de souris. A droite, cœur entier non fixé ; à gauche, cœur fixé dont on a excisé les oreillettes. L'artère coronaire gauche antérieure est mise en évidence suite à une perfusion d'hématoxyline.

6.2. L'échocardiographie de la souris

L'échocardiographie est une technique non invasive d'exploration morphologique et dynamique du cœur par ultrasons. Le traitement des données se fait par l'analyse du temps de retour des ultrasons émis, permettant d'estimer la distance séparant la sonde de l'interface explorée. Chaque structure cardiaque rencontrée par les ultrasons réfléchit un écho, caractéristique par sa position et sa mobilité¹⁹⁶. Le développement récent de sondes de plus

petites tailles fonctionnant à des fréquences élevées a permis de réaliser des échocardiographies chez la souris et donne ainsi accès à la visualisation en 2D des structures cardiaques en temps réel. Cette technique est la plus utilisée pour le suivi de la fonction du VG chez les petits animaux. Elle offre l'avantage d'un examen non invasif de courte durée et ne nécessite donc qu'une faible anesthésie. La majorité des mesures obtenues le sont en mode M. Les paramètres ainsi obtenus sont les diamètres télédiastoliques et télésystoliques du VG et l'épaisseur des parois antérieures et postérieures. La fraction de raccourcissement (FR, FR (%) = (diamètre interne du VG en diastole - diamètre interne du VG en systole)/ diamètre interne du VG en diastole)*100) est calculée à partir des diamètres. L'examen échographique peut également étudier les variations de fréquences des échos réfléchis par une interface mobile (flux sanguin), permettant de mesurer la vitesse de déplacement de celui-ci. Un signal Doppler pulsé est ainsi obtenu et donne accès aux flux aortique, pulmonaire et mitral ; le débit cardiaque peut également être calculé à partir de ces données¹⁹⁷. Dans le cas d'IM, le territoire akinétique peut être obtenu avec précision et la dilatation du VG et le remodelage ventriculaire peuvent être étudiés. Le « strain imaging » est une technique émergente basée sur l'étude de la déformation myocardique et permettant d'évaluer les fonctions cardiaques systoliques et diastoliques. Le « strain rate », quant à lui, étudie des profils de vitesse de la déformation myocardique¹⁹⁶. Ces paramètres permettent de détecter des variations subtiles du mouvement ou de l'épaisseur des parois du ventricule et reflètent la fonction régionale grâce à l'évaluation des déformations locales du myocarde. Ils identifient ainsi précisément les dysfonctions cardiaques suite à l'ischémie et les différents stades de viabilité du myocarde. Plus précisément, le strain est directement lié au raccourcissement de fibres cardiaques et le strain rate à la vitesse de raccourcissement qui correspond à la contractilité. Le strain diminue rapidement après l'induction de l'IM et permet de prédire spécifiquement l'extension transmurale de l'infarctus¹⁹⁸.

6.3. Technique de sonde à conductance : boucle pression-volume

Pour étudier plus en détail, dans un modèle murin, la relation pression-volume qui fournit de bons indices sur la fonction systolique et diastolique du VG, il est maintenant possible de recourir à une sonde à conductance miniature¹⁹⁹. Pour ce faire, un micromanomètre à conductance, qui permet d'enregistrer le volume et la pression dans les cavités cardiaques, est introduit par l'artère carotide droite jusqu'au ventricule gauche. Des boucles pression-volume sont ainsi obtenues et permettent de mesurer des paramètres de

contractilité indépendants de la charge sanguine (l'élastance (Ees, pente des différentes boucles pression-volume), le volume fin diastole, Tau...), ainsi que des paramètres obtenus en faisant varier la précharge (le « Stroke volume », le « Stroke work »,...). Cette méthode, dont le principal désavantage est d'être invasif, souvent réalisé lors d'une manipulation terminale, renseigne sur des paramètres qui ne sont pas accessibles par d'autres techniques.

6.4. Single photon emission computed tomography (SPECT)

Le « Single photon emission computed tomography » (SPECT) est une technique d'imagerie tomographique en médecine nucléaire utilisant la détection de rayons γ . Basée sur la biodistribution d'éléments marqués radioactivement, proportionnellement au flux sanguin, l'étude de la perfusion, couplée à l'analyse de la fonction cardiaque globale et régionale du VG, est réalisée quotidiennement en clinique. Les techniques d'acquisition de la perfusion myocardique par μ SPECT ont été récemment adaptées à l'imagerie des rongeurs, notamment en augmentant la résolution spatiale, et offrent l'avantage de reconstituer le cœur en 3D. L'étude de la perfusion myocardique est une technique d'imagerie fonctionnelle permettant le diagnostic d'ischémie cardiaque. En effet, le myocarde malade recevant moins d'apport sanguin fixe moins le traceur. Il est ainsi possible de déterminer précisément la taille de la zone infarctée, mais, également de déterminer spécifiquement les segments atteints. Le ^{99m}Tc -sestamibi est usuellement utilisé pour l'exploration de la perfusion cardiaque.

Objectifs et plan du travail

Objectifs et plan du travail

Les champs d'investigation décrits en thérapie tissulaire cardiaque sont très captivants et prometteurs mais suscitent cependant un nombre appréciable de questions. On ne connaît pas encore la nature ni le phénotype des cellules d'origine médullaire, de type CSH, CSM ou de type PE, impliquées dans les phénomènes de réparation cardiaque par transdifférenciation. Les méthodes idéales de prélèvement, sélection, amplification et transplantation de ces cellules à potentialité réparatrice restent également mal définies. D'autre part, le G-CSF est une cytokine puissante dont il a été démontré qu'elle pouvait améliorer la fonction et la perfusion cardiaque après un infarctus du myocarde, non seulement en mobilisant les CS de la MO, mais également en exerçant des effets cardioprotecteurs directs. Toutefois, des études complémentaires sont requises afin de clarifier l'intérêt d'un traitement complémentaire par du G-CSF chez les patients souffrant d'infarctus aigu du myocarde.

L'objectif général du travail était d'optimiser les protocoles de thérapie cellulaire de réparation cardiaque après infarctus du myocarde expérimental, et en particulier d'étudier les modalités idéales d'utilisation du G-CSF dans ce type de modèle.

Notre laboratoire possédant déjà l'expérience requise relative à la sélection et la culture *ex vivo* de CSH, nous avons dans la **première partie** de notre travail, défini les conditions de culture optimales pour CSMh et CSMm. Nous avons alors caractérisé ces cellules des points de vue croissance et cycle cellulaire, fonctionnalité et phénotype. Nous avons également vérifié si les CSM amplifiées *ex vivo* ont toujours la capacité de se différencier *in vitro* en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes, mais surtout en cardiomyocytes. Nous avons ensuite vérifié l'expression de la GFP dans les CSMm afin de greffer ultérieurement ces cellules facilement identifiables par leur fluorescence, chez des animaux souffrant IM.

Les modèles animaux sont fréquemment utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques cardiaques et tester les nouvelles stratégies thérapeutiques. Les modèles murins présentent de nombreux avantages ; toutefois, l'évaluation de la fonction cardiaque reste plus difficile d'accès que chez les gros animaux. La **seconde partie** du travail a consisté à mettre au point un modèle d'infarctus du myocarde par occlusion de l'artère coronaire chez la souris. Ce modèle animal sera utilisé pour évaluer l'impact du G-CSF sur la fonction cardiaque. Parallèlement, nous avons également développé des techniques d'histologie et

d'immunohistologie qui permettront d'analyser la régénération tissulaire cardiaque après mobilisation de CS par du G-CSF. Deux anticorps dirigés contre l' α actinine et la connexine 43 marquent les cardiomyocytes de façon spécifique. La connexine 43 permet plus précisément de mettre en évidence les connexions entre cellules cardiaques. Un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD31 nous permet de mettre en évidence l'angiogenèse. Afin de compléter l'étude de la perfusion cardiaque, nous avons eu recours à un nouveau système d'imagerie par SPECT. Au vu de l'intérêt croissant pour l'utilisation du SPECT afin de déterminer la taille de l'infarctus dans des modèles murins de pathologies cardiovasculaires, nous avons développé un protocole d'imagerie par SPECT *in vivo* afin d'estimer la perfusion myocardique chez la souris ; nous avons ensuite validé cette méthode par la comparaison des mesures obtenues à celles de la taille de l'infarctus du myocarde par histologie. Nous avons enfin mis au point des techniques échographiques et de sonde à conductance chez la souris afin de pouvoir évaluer l'évolution des paramètres hémodynamiques cardiaques dans notre modèle murin d'IM.

Avant d'évaluer la contribution du G-CSF aux phénomènes de réparation du tissu cardiaque lésé suite à une diminution de la perfusion, nous avons tout d'abord, dans la **3^{ème} partie** de notre travail, étudié la capacité du G-CSF à mobiliser les CSH, CSM et PE chez des souris saines. Nous avons voulu évaluer la cinétique de mobilisation des cellules progénitrices ainsi que l'impact sur la MO de souris injectées quotidiennement pendant 1 à 10 jours par du G-CSF. La capacité clonogénique des CS de la MO et du SP chez ces souris a également été estimée. Nous voulions également vérifier l'impact d'un traitement par du G-CSF sur la perfusion et les performances du muscle cardiaque d'une souris saine. A notre connaissance, l'effet de l'administration du G-CSF sur la perfusion cardiaque dans un cœur normal n'a jamais été étudié.

Nous avons ensuite mis au point, chez trois sujets sains mobilisés par du G-CSF ou de l'EPO, l'analyse par FACS des cellules progénitrices ainsi que les essais fonctionnels de formation de colonies, qui permettront d'évaluer la cinétique de mobilisation de ces cellules dans le SP.

L'objectif de cette partie du travail est de tenter de déterminer le timing le plus approprié pour l'administration du G-CSF: non seulement, pour améliorer la collecte par aphérèse des 3 types de cellules progénitrices, mais également, pour établir le meilleur protocole pour l'usage du G-CSF en thérapie cellulaire.

Enfin, dans la **4^{ème} partie** de notre travail, nous avons examiné si la survenue d'un infarctus du myocarde pouvait affecter la mobilisation de cellules progénitrices dans le SP et la MO et avons par la suite étudié la contribution du G-CSF à la réparation du tissu cardiaque dans notre modèle murin de ligature de l'artère coronaire. L'impact sur la survie, la fonction hémodynamique cardiaque et la perfusion de deux schémas de traitement par du G-CSF ont été étudiés par l'usage complémentaire de l'échographie Doppler, l'imagerie « strain » 2-dimension non-Doppler, l'évaluation hémodynamique à partir de boucles pression-volume et l'imagerie μ SPECT. Pour ce faire, les animaux ligaturés sont administrés journalièrement par du G-CSF, soit pendant 5 jours après l'infarctus, soit pendant 5 jours avant et 5 jours après la chirurgie. Une semaine après l'induction de l'IM, les modifications fonctionnelles et structurelles induites par l'infarctus et le traitement au G-CSF sont évaluées.

Nous avons enfin évalué, de façon préliminaire, l'effet dans notre modèle murin d'IM de l'administration de VEGF classique ou d'une molécule de VEGF délétée de son exon 5, qui la rend résistante à la protéolyse induite par la plasmine.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

1. Espèces murines

Les expériences animales sont réalisées selon les règles de l'Institution et sont préalablement approuvées par le Comité d'Ethique animale de l'Université de Liège.

1.1. Souris C57Bl/6

L'espèce de souris C57Bl/6 est l'une des souches de souris consanguines les plus utilisées en recherche scientifique. Ces souris ont une longue durée de vie, mettent bas 4 à 5 petits par portée et l'intervalle entre deux mise-bas est de 33 jours.

1.2. Souris C57Bl/6-TgN(ACTbEGFP)1Osb (GFPtg)

Cette souche de souris transgéniques (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) possède un génome identique aux souris C57Bl/6 classiques, excepté pour l'insertion d'un gène codant pour la « Green Fluorescent Protein » (GFP). Elles expriment donc ubiquitairement cette protéine, rendant les cellules de ses différents tissus fluorescentes.

2. Préparation des prélèvements de cellules humaines

Les prélèvements de moelle et de sang de cordon ombilical ainsi que les études cliniques sont réalisés selon les règles de l'Institution et sont préalablement approuvés par le Comité d'Ethique du CHU de Liège.

Après avoir obtenu le consentement éclairé des patients, 40 ml de moelle osseuse (MO) sont aspirés de la crête iliaque de donneurs sains et 5 ml de sang EDTA, 5 ml de sang coagulé et 40 ml de sang hépariné sont prélevés.

Après avoir obtenu le consentement éclairé des mères, le sang de cordon ombilical de leur bébé est collecté après la délivrance.

La MO, le sang et le sang de cordon ombilical sont dilués 1:1 dans du PBS et centrifugés sur un gradient de densité Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) à 500g, pendant 20 min à température ambiante. Les cellules mononuclées sont récupérées à l'interface du gradient de densité et lavées dans du PBS.

3. Culture cellulaire

3.1. Cellules souches mésenchymateuses murines (CSMm)

Les CSMm sont obtenues à partir des souris C57Bl/6-TgN(ACTbEGFP)1Osb (GFPTg). Ces souris sont tuées à l'âge de 8 à 10 semaines par dislocation cervicale. Leurs tibias et fémurs sont prélevés et la moelle osseuse (MO) est chassée dans du milieu de culture. Après un lavage par centrifugation à 900 g pendant 8 min, les cellules sont resuspendues dans du «Dulbecco's modified Eagle's medium» contenant 4.5 g/l de glucose (DMEM; GIBCO, Merelbeke, Belgique), auquel sont ajoutés 10% de sérum fœtal bovin (FBS; GIBCO), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Elles sont ensuite mises en culture à une densité cellulaire de 2×10^4 cellules par cm^2 . Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide composée de 5% de CO₂. Après 24h, les cellules non adhérentes sont éliminées par un lavage au PBS (Biowhittaker, Verviers, Belgique) et le milieu est changé tous les 3 à 4 jours. Lorsque les cellules sont confluentes à 85%, elles sont lavées au PBS et détachées par une incubation de 10 min à 37°C dans une solution de trypsine 0,1% (Biowhittaker).

3.2. Cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh)

Les cellules mononuclées obtenues grâce au gradient de densité sont lavées dans du PBS et resuspendues, soit dans du DMEM contenant 1g/l de glucose (DMEM-LG; GIBCO) auquel sont ajoutés 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 25 µg/ml d'amphotéricine B, soit dans du «Mesenchymal Stem Cells Growth Medium» (MSCGM, Biowhittaker Europe). Les cellules sont alors mises en culture à 5×10^4 cellules par cm^2 . Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide composée de 5% de CO₂. Après 24h, les cellules non adhérentes sont éliminées par un lavage au PBS et le milieu est changé tous les 3 à 4 jours. Lorsque les cellules sont confluentes à 85%, elles sont lavées au PBS et détachées par une incubation de 10 min à 37°C dans une solution de trypsine 0.1%.

3.3. Cellules souches hématopoïétiques humaines (CSHh)

Les CSHh sont obtenues à partir de sang de cordon ombilical. Les cellules CD34⁺ sont isolées à partir des cellules mononuclées obtenues à la fin du gradient de densité et sont

purifiées à la suite d'une sélection immunomagnétique réalisée selon les instructions du kit MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Allemagne). La pureté des cellules CD34⁺ ainsi obtenues est vérifiée par cytométrie de flux et est supérieure à 97%.

Les cellules CD34⁺ sont cultivées dans un milieu d'expansion à court terme qui est composé de 20% de BIT (Stem Cell Technologies, Meylan, France), 2 mmol/L d'alanyl-glutamine, 1% (v/v) de lipides riches en cholestérol, 1 mmol/L de sodium pyruvate (tous de chez Sigma), 100 U/mL pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 5×10^{-2} mmol/L de 2-mercaptoethanol (tous de chez Biowhittaker). Les cellules sont stimulées pendant 72h par une combinaison de 3 cytokines (100 ng/mL de « stem cell factor » (SCF ; Amgen), thrombopoïétine (TPO; Amgen) et flt-3 ligand (FL; Peprotech, Boechout, Belgique) ou de 5 cytokines (combinaison de cytokines identiques plus 20 ng/mL d'interleukine-6 (IL-6 ; Amgen) et de « granulocyte-colony stimulating factor » (G-CSF; Amgen).

3.4. Congélation des cellules

Les cellules sont suspendues dans du FBS additionné de 5% de dimethylsulfoxyde (DMSO) et congelées à -80°C pendant 24h, avant d'être conservées dans de l'azote liquide. Pour décongeler les aliquots, les cellules sont rapidement réchauffées à 37°C, lavées afin d'éliminer le DMSO et mises en culture dans le milieu adéquat.

3.5. "Colony-forming units granulocyte-macrophage" (CFU-GM)

Les cellules humaines sont mises en culture pendant 16 jours à une densité de 2×10^4 cellules/boîte de culture de 35 mm pour la MO, et à 2×10^5 cellules/boîte de culture de 35 mm pour le sang dans le milieu Methocult[®] GF M4434 (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). Les cellules murines sont mises en culture pendant 16 jours à une densité de 5×10^4 cellules/boîte de culture de 35 mm pour la MO, et à 2×10^5 cellules/boîte de culture de 35 mm pour le sang dans le milieu Methocult[®] GF M3434 (Stemcell Technologies). Après 2 semaines, les CFU-GM sont dénombrées à l'aide d'un microscope inversé, à un grossissement de 40 X.

3.6. “Colony-forming units-fibroblasts” (CFU-F)

Les cellules humaines sont mises en culture à une densité de 2×10^6 , 1×10^6 et $0,5 \times 10^6$ cellules/boîte de culture de 25 cm^2 pour la MO et à 10×10^6 , 5×10^6 et 2×10^6 cellules/boîte de culture de 25 cm^2 pour le sang, dans du Mésencult (Stemcell Technologies). Les cellules murines sont mises en culture à une densité de 5×10^4 cellules/boîte de culture de 25 cm^2 pour la MO et à 2×10^5 cellules/boîte de culture de 25 cm^2 , dans du DMEM auquel sont ajoutés 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine. Les cultures sont maintenues 21 jours et le milieu est changé tous les 3 jours. Les cellules sont ensuite fixées au méthanol et colorées à l'hématoxyline-éosine pendant 10 min à température ambiante. Toutes les colonies visibles sont comptées.

3.7. “Colony-forming units fibroblast-initiating cells” (CFUF-IC)

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de culture 96 puits à une densité variant de 5×10^5 à 5 cellules/ cm^2 dans du DMEM auquel sont ajoutés 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine. Après 2 semaines de culture, le nombre de puits positifs est compté. Le pourcentage de CFUF-IC est calculé à l'aide du programme L-calc (Stemcell Technologies).

3.8. Formation de colonies de cellules endothéliales

3.8.1. “Endothelial cell colony-forming units” (CFU-EC)

Cinq millions de cellules de la moelle ou du sang humain sont placées dans un puits de plaque de culture 6 puits revêtus à la fibronectine (Becton Dickinson) dans le milieu de culture Endocult (Stemcell Technologies). Après 48H, les cellules non adhérentes sont remises en culture à une densité de 10^6 cellules par puits de plaque de culture 24 puits revêtus à la fibronectine et cultivées pendant 3 jours. Les colonies présentant un centre formé de cellules rondes et entourées de cellules d'aspect fibroblastique peuvent alors être dénombrées.

3.8.2. “Endothelial colony-forming cells” (ECFC)

Cent septante-cinq millions de cellules de la moelle ou du sang humain sont placées dans un puits de plaque 6 puits coâtés avec du collagène de queues de rats de type I (BD Biosciences) dans du milieu « Endothelium Basal Medium 2 » (EBM-2, Cambrex, Mayerland, USA) supplémenté par 2% pénicilline/streptomycine et 0.25 g/mL d’amphotéricine B à 37°C dans une atmosphère humide composée de 5% de CO₂. Après 24h, les cellules non adhérentes et les débris cellulaires sont aspirés, les cellules adhérentes sont lavées et cultivées pendant 15 jours supplémentaires. Les colonies formées uniquement de cellules rondes apparaissent entre 5 et 15 jours de culture et sont alors dénombrées.

3.9. Différenciation des CSM en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes

Les cellules sont mises en culture à une densité de 5×10^2 cellules/cm² dans des boîtes de culture de 58 cm² contenant du DMEM auquel sont ajoutés 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

Pour la différenciation en ostéoblastes, les cellules sont incubées dans du DMEM avec 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, auxquels sont ajoutés 12 mM de L glutamine, 20 mM de β-glycerol phosphate (Sigma, Bornem, Belgique), 50 ng/mL de thyroxine (Sigma), 1 nM de dexaméthasone (Sigma) et 0.5 µM d’ascorbate-phosphate (Sigma). La culture est maintenue pendant 3 semaines et le milieu changé 2 fois par semaine. Les cellules sont alors fixées par 10% de formaline pendant 20 min à température ambiante et colorées par de l’Alizarine rouge (Sigma) à pH 4,1 pendant 20 min à température ambiante.

Pour la différenciation en adipocytes, les cellules sont incubées dans du DMEM avec 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, auxquels sont ajoutés 12 mM de L-glutamine, 5 g/mL d’insuline (Sigma), 50 µM d’indométacine (Sigma), 1×10^{-6} M de dexaméthasone et 0.5 µM de 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma). La culture est maintenue pendant 3 semaines et le milieu changé 2 fois par semaine. Les cellules sont alors fixées par 10% de formaline pendant 20 min à température ambiante et colorées par de l’« Oil Red O » (Sigma) à pH 4.1 pendant 20 min à température ambiante.

Pour la différenciation en chondrocytes, 2×10^5 cellules sont placées dans un tube à fond conique en polypropylène (BD Biosciences, Erembodegem-Aalst, Belgique) et centrifugées pour former un culot cellulaire. Le culot est maintenu en culture dans du DMEM avec 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine auxquels sont ajoutés 500 ng/mL

de « Bone Morphogenetic Protein-6 » (BMP-6; R&D Systems, Minneapolis, USA), 10 ng/mL de « Transforming Growth Factor β 3 » (TGF- β 3), 10^{-7} M de dexaméthasone, 50 μ g/mL d'ascorbate-2-phosphate, 40 μ g/mL de proline, 100 g/mL de pyruvate, 50 mg/mL d'ITS - Premix (BD), 6.25 μ g/mL d'insuline, 6.25 μ g/mL de transferrine, 6.25 ng/mL de sélénium, 1.25 mg/mL d'albumine de sérum de boeuf et 5.35 mg/mL d'acide linoléique. La culture est maintenue pendant 3 semaines et le milieu changé 2 fois par semaine. Le culot est alors inclus dans la paraffine, coupé en sections de 5 μ m puis coloré au Sodium borate Toluidine bleu.

3.10. Différenciation des CSM en cardiomyocytes

Les cellules sont mises en culture à 2×10^4 cellules par cm^2 pour les CSMm et à 5×10^4 cellules par cm^2 pour les CSMh dans le milieu de culture approprié (voir § 3.1 et 3.2). Après 24h, le milieu de culture est additionné de 10 μ M de 5-azacytidine. Selon le protocole testé, le milieu de culture ainsi supplémenté est maintenu sur les cellules, soit pendant 24H, soit 2 semaines ou encore 3 semaines. Les cellules sont alors lavées et remises en culture dans du milieu sans 5-azacytidine.

4. Analyse du cycle cellulaire

4.1. Hoechst 33342

Les cellules sont resuspendues dans une solution tampon contenant 5 μ g/ml d'Hoechst 33342 (Hst, Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Le tampon Hst est constitué de « Hanks Balanced Salt Solution » (HBSS; Biowhittaker), d'1 g/L de glucose, et de 10% de sérum foetal de boeuf (FCS, Biowhittaker). L'histogramme du contenu en ADN des cellules est obtenu en cytométrie de flux à partir de la fluorescence de l'Hoechst (excité dans l'UV proche (350 nm) et émettant dans les régions bleues du spectre (450 nm)).

4.2. Iodure de propidium

Les cellules sont incubées dans du PBS contenant 0.6% d'IGEPAL CA-630 (Sigma), 50 μ g/ml d'iodure de propidium (IP, Sigma) et 1 mg/ml de RNase (Boehringer, Mannheim, Allemagne). Après 30 min d'incubation à 4°C dans l'obscurité, les cellules sont analysées par cytométrie de flux dans le canal FL-2 (excitation de l'IP 370-560 nm, émission 631 nm). La

proportion des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est déterminée grâce au programme ModFit (Verity Software, Topsham, USA).

4.3. Draq 5

Quatre millions de cellules mononuclées sont suspendues dans du PBS, auquel sont ajouté 10 μ M de Draq 5 (Biostatis, Angleterre). Les cellules sont vortexées et incubées 30 min à température ambiante. Les échantillons peuvent alors être directement analysés sans lavage supplémentaire. Les molécules de Draq 5 sont excitées entre 488 et 647 nm et commencent à émettre au-delà de 665 nm bien que le filtre optimal pour l'étude du cycle cellulaire soit un 715 « long pass ».

5. Analyse du phénotype des CSM par cytométrie de flux

Après culture, les cellules sont lavées et le surnageant est éliminé. Pour l'analyse des CSMm, 5 μ l d'anticorps monoclonaux de rats anti-souris CD45 fluorescéine isothiocyanate (FITC) (IgG2b κ), CD34 biotinilé (IgG2a κ), CD11b phycoérythrine (PE) (IgG2b κ), CD106 biotinilé (VCAM 1, IgG2a κ) et Sca1 biotinilé (IgG2a κ) (tous de chez BD Biosciences) sont ajoutés au culot et les cellules sont incubées 30 min à 4°C. Les cellules sont lavées et 5 μ l de streptavidine allophycocyanine (APC) (Molecular Probes) sont ajoutés au culot et les cellules sont incubées 30 min à 4°C. Les cellules sont alors lavées et fixées dans du PBS contenant 1% de formaldéhyde.

Pour l'analyse des CSMh, 5 μ l d'anticorps monoclonaux CD34 FITC (IgG1, BD Biosciences), CD45 FITC (IgG1, Iotest), HLA-Dr (IgG1, Immunotech), CD80 FITC (IgG1, BD Biosciences), CD31 FITC (PECAM, IgG1, BD Biosciences), HLA-1 PE (IgG1, BD Biosciences), CD73 PE (SH3, SH4, IgG1, BD Biosciences), CD90 PE (Thy-1, IgG1, BD Biosciences) et CD105 PE (Endoglin, IgG1, Serotec) sont ajoutés au culot et les cellules sont incubées 30 min à 4°C. Les cellules sont alors lavées et fixées dans du PBS contenant 1% de formaldéhyde.

Les échantillons sont ensuite analysés à l'aide du FACSCANTO (BD Biosciences).

6. Mesure du calcium intracellulaire

Un million de cellules sont suspendues dans 10 ml de tampon Krebs auquel est ajouté 4 μ M de Fluo-4 (Molecular Probes) et sont incubées pendant 1 h à 37°C. Le tampon Krebs est composé de 118.8 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 4.7 mM de MgSO₄, 2.5 mM de CaCl₂, 1.18 mM de KH₂PO₄, 25 mM de NaHCO₃ et 1.1 mM de glucose. Le pH du tampon est amené à 7.4. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues dans le tampon Krebs. La fluorescence émise par le Fluo-4 (excitation 488 nm, émission 525 nm) peut alors être mesurée dans les cellules non traitées ou stimulées par 6.75mM de KCl à l'aide d'un fluorimètre (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA).

7. Etude de la contraction dans un gel de collagène

Deux cent cinquante mille cellules sont resuspendues dans 50 μ l de PBS et sont ajoutées à 3 ml de milieu composé de 1 mg/ml de collagène, 0,5 ml de DMEM 10x, 0.420 g de soude, 0.0584 g de glutamine, 0.01 g d'acide ascorbique, du NaOH 0.1M, 100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine. Le gel ainsi formé est versé dans une boîte de 60 mm² non traitée pour la culture. Le diamètre du gel est mesuré toutes les heures pendant 12 heures, puis le matin et le soir pendant 10 jours.

8. Identification de facteurs de transcription

8.1. Extraction différentielle de protéines

Un volume de 400 μ l de solution d'homogénéisation de Tris-HCL 50 mM à pH 7.4 contenant divers inhibiteurs de protéases (Benzamidine 5 mM, N-éthylmaleimide 5 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche, Neuilly sur Seine, France)) est ajouté à 20x10⁶ cellules. Un homogénéisateur de Potter, verre fritté contre verre fritté, est utilisé pour le broiement (une vingtaine de passages). Le surnageant, enrichi de protéines solubles, est conservé et le culot est broyé à l'aide d'un homogénéisateur de Potter contenant 1% de Triton X100. Après la centrifugation, dans les mêmes conditions que ci-dessus, le surnageant, enrichi en certaines protéines membranaires, est conservé et le culot est mis en suspension dans la solution d'homogénéisation contenant 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS, INC Biomédicals Inc, Costa Mesa, USA). Une centrifugation de 15 min à

26×10^3 g à température ambiante permet de récupérer le surnageant, enrichi en certaines protéines du cytosquelette. Les surnageants sont congelés à -80°C .

Le kit « Protein Assay » (Bio-Rad, Nazareth Eke, Belgique) est utilisé conformément aux instructions. La technique est basée sur le principe de Lowry.

8.2. Détection de facteurs de transcription par microarray

Nous avons étudié la présence de 12 facteurs de transcription suivant les instructions du kit « TF Chip Stem Cell » (Eppendorf, Louvain, Belgique) dans des populations de CSM humaines ou murines, différenciées ou non en cardiomyocytes. Les facteurs de transcription détectés sont un marqueur ostéogénique ($\text{CBF}\alpha 1$), 2 marqueurs adipogéniques ($\text{C/EBP}\beta$ et $\text{PPAR}\gamma$), un marqueur cardiogénique (GATA-4), 2 marqueurs de la lignée myogénique (MEF2 et MyoD), un marqueur hépatique ($\text{HNF-4}\alpha$) et 2 marqueurs hépatiques et pancréatiques ($\text{HNF-1 } \alpha/ \beta$ et $\text{HNF-3 } \alpha$), un marqueur de pluripotentialité (Oct-4), un marqueur de l'apoptose (p53) et un marqueur de prolifération notamment activé dans les CS en cycle (STAT3). De façon succincte, le protocole consiste en un blocage préalable d'une heure de la membrane sur laquelle sont alors coatées les molécules d'ADN double brin reconnues par les facteurs de transcription. Ensuite, les extraits protéiniques des échantillons sont incubés une nuit à température ambiante sur la membrane. La membrane est alors lavée, un cocktail d'anticorps primaires est ajouté pendant une heure puis elle est à nouveau lavée. Les anticorps secondaires biotinilés sont alors incubés 10 min puis lavés. La révélation est réalisée par colorimétrie à l'aide du kit « Silverquant detection » (Eppendorf), les lames sont ensuite scannées à l'aide du programme « Silverquant scan » (Eppendorf) et analysées par le programme d'analyse « Silverquant » (Eppendorf). Grâce à une courbe de calibration réalisée précédemment, une évaluation quantitative peut être donnée pour chaque spot.

9. Transduction de CSM par un lentivirus

9.1. Production de lentivirus

La lignée cellulaire 293FT est originaire de cellules embryonnaires primaires de rein humain transformées par un adénovirus. Ces cellules expriment de façon stable le « SV40 large T antigen » du plasmide pCMVSPORT6Tag.neo (plasmide neoR). Cette transformation participe à une transactivation de certains promoteurs viraux, permettant à ces cellules de

produire un taux élevé de protéines. Cette lignée cellulaire, très efficace pour la production des lentivirus, est cultivée dans du milieu DMEM supplémenté de 5% de FBS, de 0.1% de glutamine et de 0.01% de généticine (antibiotique marqueur de sélection des cellules 293T ayant intégré le plasmide neoR). Trois plasmides codant les différents constituants du lentivirus (R8.91, VSVG et le plasmide d'intérêt comme PLL3.7 pour la GFP) sont précipités par du phosphate de calcium sur ces cellules. Un traitement par du DMSO n'est pas vraiment nécessaire : le taux de transfection est identique avec ou sans DMSO. Le nombre de particules virales (Vp) dans le surnageant est déterminé par titration : soit par ELISA pour déterminer les Vp totales (fonctionnelles ou non), soit par la méthode M.O.I. (= « multiplicity of infection ») pour doser les Vp fonctionnelles uniquement.

9.2. Transduction des CSM

En fonction de la MOI, les CSM sont cultivées pendant 24h au contact des lentivirus concentrés et en présence de polybrène 6µg/mL. Quarante-huit à 72 H plus tard, les CSM ont intégré le virus et expriment le transgène, comme le montrent les analyses en cytométrie de flux.

10. Dosage de la troponine T, SDF-1 et G-CSF

La concentration en troponine est déterminée sur des échantillons de plasma murin obtenus par centrifugation de sang complet hépariné. Le dosage est réalisé suivant les instructions du kit « Cobas » (Roche Diagnostics, Meylan, France) par électrochimiluminescence, suivant une méthode « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA) « sandwich ». Les mesures sont effectuées sur l'analyseur Elecsys (Roche Diagnostics) et les résultats obtenus à l'aide d'une courbe de calibration.

Les échantillons de plasma murin ont également permis d'évaluer les concentrations de G-CSF et le SDF-1. Le dosage est réalisé suivant les instructions du kit RayBio ELISA (RayBiotech, Tebubio SA, Le Perray en Yvelines, France).

11. Analyses histologiques, immunohistochimiques et immunofluorescence

11.1. Histologie et détermination de la taille de la zone infarctée

Après le sacrifice des souris, les cœurs sont prélevés et colorés dans une solution de TTC (2,3,5-triphényl tétrazolium chloride) 1.0 % dans un tampon phosphate à pH 7.4. Les cœurs sont pesés puis coupés en 4 coupes transversales, chacune de ± 1 mm d'épaisseur et sont fixés dans de la formaline. Chaque coupe est pesée puis photographiée. Une analyse planimétrique, mesurant précisément la surface de chaque coupe, mais également le territoire infarcté peut alors être réalisée à l'aide du programme ImageJ (Bethesda, Maryland). Les 4 coupes par cœur peuvent ensuite être incluses dans la paraffine, coupées en fines sections de 4 μ m et colorées à l'hématoxyline éosine ou par une préparation de Masson Trichrome. La taille de l'infarctus est déterminée par planimétrie à l'aide du programme Histolab (Microvisions, Paris, France) qui permet de mesurer la surface des zones colorées en vert par le marquage Masson Trichrome. Le poids (P) de chacune des 4 coupes transversales est exprimé en proportion du poids du cœur total. Pour chaque coupe transversale, la région infarctée (I) est exprimée proportionnellement à l'aire totale de la coupe. L'aire de la zone infarctée est déterminée selon le calcul suivant : $(P \times I) \text{ coupe } 1 + (P \times I) \text{ coupe } 2 + (P \times I) \text{ coupe } 3 + (P \times I) \text{ coupe } 4 \times 100$. Les analyses histologiques sont réalisées après les marquages.

11.2. Immunohistochimie

Les cœurs excisés sont inclus dans du « Tissue-Tek OCT » (Sakura, Zoeterwoude, Pays-Bas). Les échantillons sont coupés en sections de 10 μ m à l'aide d'un cryostat et fixés dans du méthanol pendant 10 min à -20°C . Les myocytes sont identifiés par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l' α -actinine sarcomérique (1/1600, Sigma, Bornem, Belgique) incubé 30 min à température ambiante et révélé par « ARK (Animal Research Kit) Peroxidase » (Dako, Heverlee, Belgique). Les coupes sont également marquées à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la connexine 43 (1/2000, Sigma) dans des conditions identiques, et révélées par une incubation de 30 min à température ambiante avec un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase. Les cellules endothéliales sont étudiées à l'aide d'un anticorps monoclonal de rat anti-souris dirigé contre le CD31 (PECAM-1, BD Biosciences). Après une incubation de 60 min à température ambiante, un anticorps de lapin anti-rat biotinilé (1/400, DAKO) est ajouté pour 30 min à RT et révélé par un anticorps

HRP couplé à la streptavidine (1/500, DAKO) incubé 30 min à température ambiante. Le nombre d'artéριοles CD31 positives est énuméré dans 5 champs par coupe.

Des CSM humaines et murines, différenciées ou non à l'aide de 5-azacytidine, sont cytopspinées sur des lames puis fixées pendant 10 min dans de l'acétone. L'expression des 3 antigènes mentionnés précédemment est également explorée dans ces cellules, selon un protocole similaire.

Les noyaux des cardiomyocytes ou des CSM sont contre-colorés à l'hématoxyline-éosine. L'observation des coupes est réalisée à l'aide d'un microscope confocal.

11.3. Immunofluorescence

Les cellules qui composent les CFU-F ont été perméabilisées à l'aide de Triton X-100 à 0,01% et puis mises en présence d'anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre le-CD73, CD31 ou CD45 (1/500, Santa Cruz, Heidelberg, Allemagne) pendant 60 min à température ambiante. Les CFU-F sont ensuite lavés et un anticorps polyclonal secondaire de lapin conjugué à la rhodamine (Abcam, Cambridge, Angleterre) est ajouté. L'observation des boîtes de culture est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

12. Analyse de la moelle et du sang des souris en cryométrie de flux

Après le sacrifice des souris, le sang est prélevé dans la veine cave inférieure et la moelle osseuse est recueillie à partir des fémurs et tibias. Les cellules du sang et de la moelle sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules automatique ABX micro 60 (HORIBA ABX Diagnostics, Anvers, Belgique). Les cellules du sang et de la moelle sont alors lavées et le surnageant éliminé. Pour l'analyse FACS, 5 µl d'anticorps monoclonaux CD45 FITC (IgG2bκ) CD34 biotinilé (IgG2aκ), CD31 PE (IgG2aκ), CD11b biotinilé (IgG2bκ), CD106 biotinilé (VCAM 1, IgG2aκ) ou Sca1 biotinilé (IgG2aκ) (tous de chez BD Biosciences) sont ajoutés au culot cellulaire et incubés 30 min à 4°C. Les cellules sont lavées et 5 µl de streptavidine APC (Molecular Probes, Invitrogen) sont ajoutés au culot pour révéler les anticorps biotinilés et incubés 30 min à 4°C. Les globules rouges sont alors lysés pendant 10 min à l'aide d'une solution de NH₄Cl et les cellules mononuclées sont lavées et fixées dans du PBS 1% formaldéhyde. Les échantillons sont ensuite analysés à l'aide du FACSCANTO. Nous avons sélectionné les cellules mononuclées vivantes sur un «scatter plot» SSC (structure interne) versus FSC (taille). Les cellules mortes sont exclues à l'aide d'un

marquage par de l'iodure de propidium. Les combinaisons d'anticorps suivantes sont analysées : CD45⁺Kit⁺Sca⁺: CSH; CD45⁻106⁺11b⁻: CSM; et CD45⁻34⁺31⁺: PE.

13. Protocole pour l'étude de la cinétique de mobilisation par du G-CSF chez la souris

Pour l'analyse de la cinétique de mobilisation, des souris saines sont injectées quotidiennement en sous-cutané (s.c.) pendant 1 à 10 jours par du G-CSF humain (Neupogen, Amgen) (50 µg/kg). Douze animaux sont sacrifiés chaque jour et le cœur, le sang et la moelle sont prélevés.

14. Etude *in vivo* d'un modèle murin d'infarctus du myocarde

14.1. Induction chirurgicale d'un infarctus du myocarde (IM)

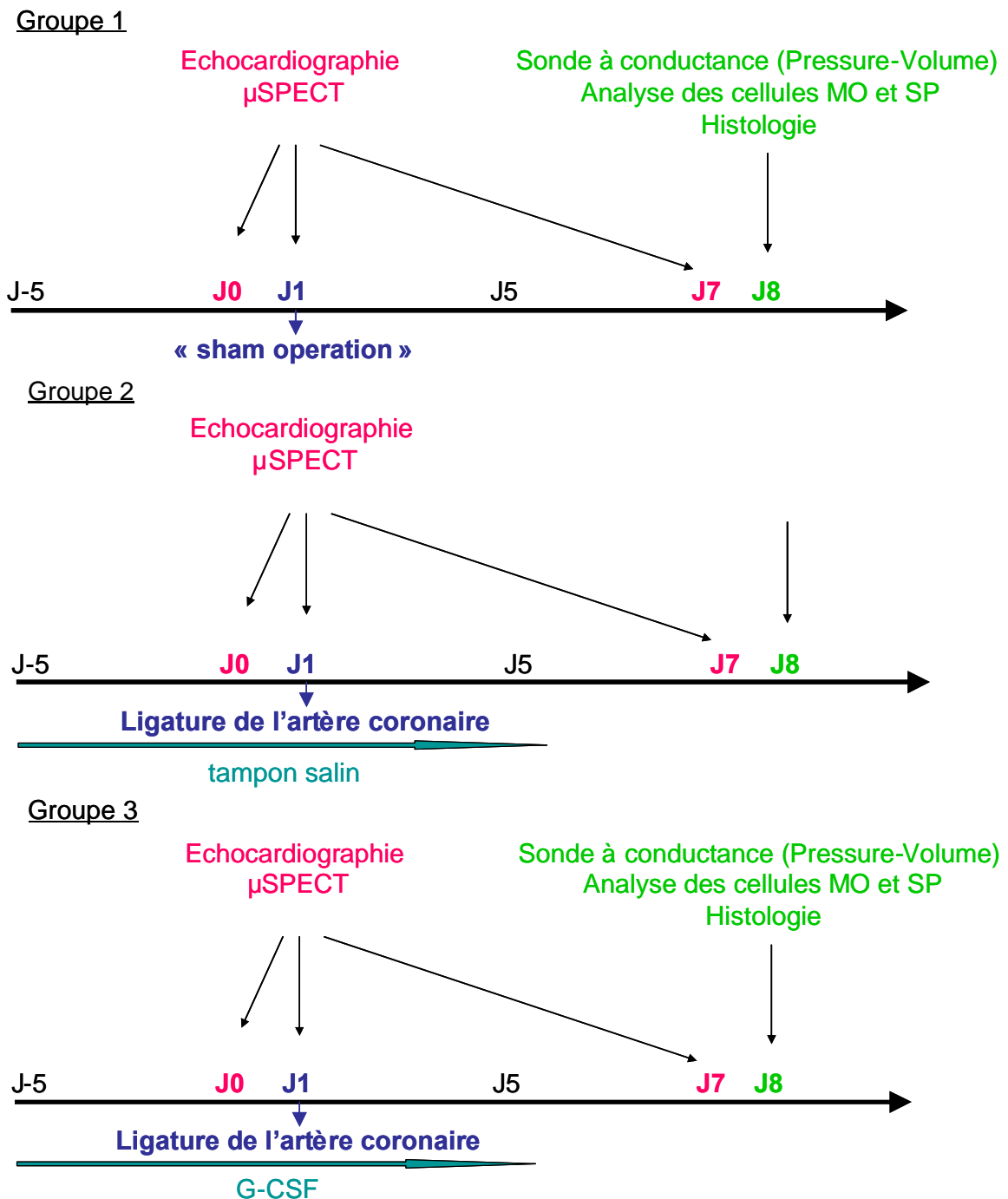
L'infarctus du myocarde est induit chez des souris femelles C57Bl/6 de 2 mois. L'anesthésie est induite par de la kétamine (100 mg/Kg) et de la xylazine (5 mg/Kg). Les souris sont intubées oralement à l'aide d'une canule d'1 mm de diamètre et ventilées à l'aide d'un respirateur (0,3ml/min et 160 insufflations/min, Harvard Apparatus, Les Ulis Cedex, France). Le cœur est exposé au travers d'un trou de thoracotomie latérale de 1 cm. L'artère coronaire antérieure descendante de chaque souris est ligaturée à l'aide d'un fil de suture 8.0 en polypropylène. L'intubation est arrêtée lorsque la souris récupère une respiration spontanée. Toute l'opération se déroule sur une plaque chauffante afin d'éviter l'hypothermie des souris. Les animaux « sham operated » subissent exactement la même procédure à l'exception de la ligature de l'artère coronaire.

14.2. Protocoles expérimentaux

14.2.1 Evaluation de la contribution du G-CSF à la réparation tissulaire cardiaque

Les animaux sont répartis en 4 groupes de 12 souris : les animaux « sham operated » (groupe 1), les animaux ayant subi la ligature de l'artère coronaire et recevant des injections de tampon salin (souris contrôles) (groupe 2) ou injectés en s.c. avec du G-CSF (50 µg/Kg) du jour -5 au jour +5 après l'induction de l'IM (groupe 3), ou du jour 0 au jour +5 après l'IM (groupe 4). Dans chaque groupe, 30 animaux sont inclus dans une étude de survie et 12 souris

supplémentaires sont réservées pour l'analyse des paramètres sanguins, l'histologie et l'immunohistologie, l'imagerie par microSPECT, l'échocardiographie et l'évaluation hémodynamique. L'échocardiographie et le microSPECT sont réalisés au J0, 1 et 7 après l'infarctus et la cathétérisation cardiaque au J8. Les animaux sont alors sacrifiés et le cœur est prélevé pour déterminer de façon conventionnelle la taille de la zone infarctée (Fig. 12).



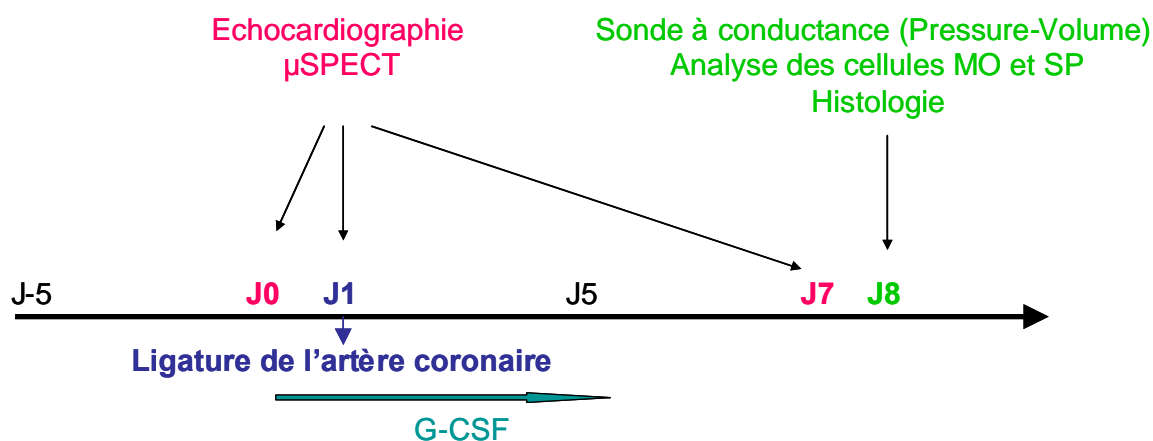


Figure 12 : Protocoles expérimentaux pour l'évaluation de la contribution du G-CSF à la réparation tissulaire cardiaque.

14.3. Echocardiographie

Les échocardiographies sont réalisées à l'aide d'un échocardiographe VIVID 7 et d'une sonde i13L. (General Electrics, Horten, Norvège). Le gel de contact est chauffé afin de maintenir une fréquence cardiaque stable. Les fonctions globales et régionales du ventricule gauche (VG) sont acquises par l'usage du mode-M, du Doppler pulsé et de l'analyse non-Doppler de déformation tissulaire (« strain ») en deux dimensions. Les dimensions systoliques et diastoliques du VG sont mesurées sur les images obtenues en mode-M acquis sur le petit axe au niveau des muscles papillaires. La fraction d'éjection du VG (FEVG, méthode Teicholtz) et la fraction de raccourcissement sont également mesurées. Le volume d'éjection systolique est calculé à l'aide de la formule usuelle qui se base sur l'équation suivante : volume de la chambre de chasse x intégrale vitesse temps aortique calculé sur le Doppler aortique x fréquence cœur ($CC2 \times VTI \times FC$). Le débit cardiaque est calculé en multipliant le volume éjecté (VE) par la fréquence cardiaque ($CO = VE \times FC$).

Des images en Doppler tissulaire ont été obtenues à partir d'une vue en petit axe parasternal au niveau du milieu du VG, à une fréquence >300 champs/s et à une profondeur de 1 cm. L'évaluation de la fonction régionale est réalisée « off-line » par un observateur et corrélée aux résultats des colorations histologiques TTC et trichrome. Le « strain » systolique radial a été mesuré sur une distance axiale de 0.6 mm. Les filtres de lissage temporels ont été enlevés pour toutes les mesures. Le « strain » systolique maximal a été calculé sur la moyenne de trois cycles cardiaques consécutifs.

14.4. Imagerie par microSPECT

14.4.1. Acquisition des images

Les animaux sont injectés dans la veine de la queue (i.v.) avec 173 ± 27 MBq de Tc-99m Sestamibi. Le Tc-99m Sestamibi est éliminé par le système hépatobiliaire ; la vésicule biliaire fixe fortement la radioactivité et se situe à proximité du cœur dans les images analysées. Cela peut interférer avec l'apex du cœur lors de la reconstruction des images. Pour éviter ce problème, $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ of cholecystokinine (CCK) sont injectés en intra-péritonéal (i.p.) 2 H après l'injection de Tc-99m Sestamibi pour favoriser la vidange de la vésicule. Les animaux sont alors scannés 30 min plus tard sous anesthésie (Kétamine ($50 \text{ mg}/\text{kg}$) et xylazine ($2.5 \text{ mg}/\text{kg}$)) à l'aide du « Linoview SPECT system » (Linoview System, Amsterdam, Pays-Bas) (Fig.13) pendant 30 min. Les caractéristiques du système SPECT ont été décrites précédemment²⁰⁰.

14.4.2. Analyses des images SPECT

Les données sont reconstruites à l'aide d'un algorithme «expectation maximization maximum likelihood » (EM-ML) sans atténuation ou correction de la résolution. Les images sont réorientées de façon conventionnelle dans l'axe court, le long axe vertical et le long axe horizontal. Le déficit de perfusion est quantifié grâce au programme QPS^{201,202} et la région d'intérêt est ajustée manuellement.

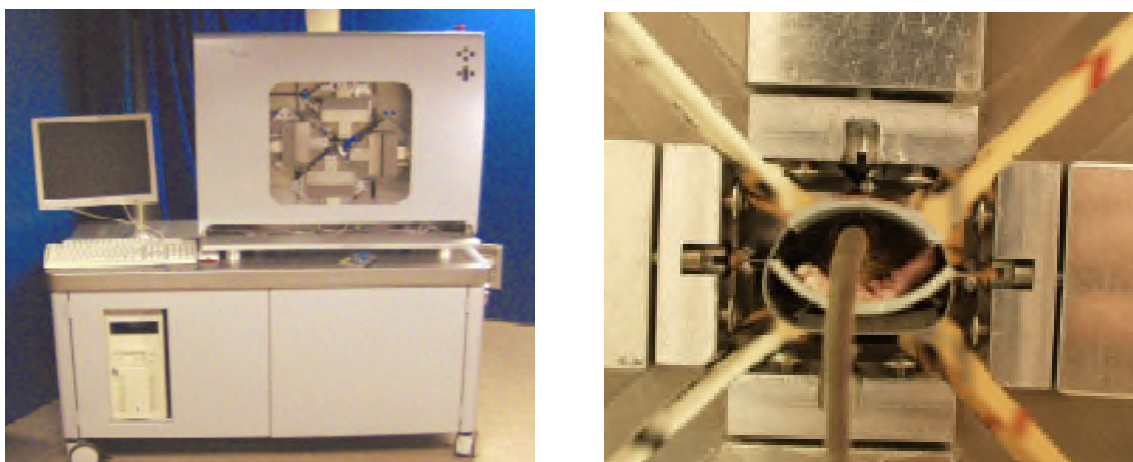


Figure 13 : Appareil de microSPECT pour les petits animaux « Linoview SPECT system ».

14.5. Sonde à conductance

14.5.1. Mesures des boucles pression-volume du VG

Les boucles pression-volume sont obtenues sur des animaux anesthésiés par un mélange de kétamine (100 mg/Kg) et de xylazine (0.5 mg/Kg), intubés, ventilés et instrumentés pour évaluer la fonction du VG par analyse de boucle pression-volume. Un cathéter 1.4F possédant des capteurs de pression et de volume est introduit dans l'artère carotide et est ensuite descendu dans le VG (Fig.14). L'abdomen est alors ouvert juste au-dessous du diaphragme pour permettre de réduire momentanément la précharge par compression directe de la veine cave inférieure.

Avant l'implantation, la calibration du cathéter est réalisée suivant les instructions de la firme. En bref, 6 puits cylindriques de 13.2 à 172.3 μ l sont remplis de sang frais hépariné de souris. A partir des signaux de conductance obtenus, les volumes connus des cylindres sont rapportés aux conductances et l'équation de régression est alors calculée. Afin de déterminer la conductance parallèle chez les animaux, de petits bolus de 10 μ l de solution hypertonique sont injectés dans la veine jugulaire. Les modifications de la conductance du sang permettent de séparer le volume du sang du VG de la conductance parallèle des tissus avoisinant le cœur.

14.5.2. Acquisition des paramètres hémodynamiques

Après le positionnement du cathéter, les données obtenues à partir des courbes pression-volume sont analysées à l'aide du programme PVAN 3.4 (Millar Instrument, Houston, USA). Les signaux de pression-volume du VG sont acquis à l'état basal afin de déterminer les paramètres hémodynamiques généraux : fréquence cardiaque (FC), pression de fin de diastole (PFD) et systole (PFS) du VG, volume de fin de diastole (VFD) et systole (VFS) du VG, volume éjecté (VM), débit cardiaque. Le travail myocardique (TM) est déterminé à partir de l'aire des courbes pression-volume. Pour obtenir la pente (élastance) de la relation pression-volume en fin de systole, un index de la fonction systolique indépendant de la charge, des courbes pression-volume sont aussi enregistrées lors d'une diminution graduelle de la précharge.

Pour obtenir des indices charge indépendants de la fonction du VG, nous avons enregistré les boucles pression-volume lors d'une réduction progressive de précharge. Les

pentés de la relation pression-volume en fin de systole permettent de calculer l'élastance (EES).

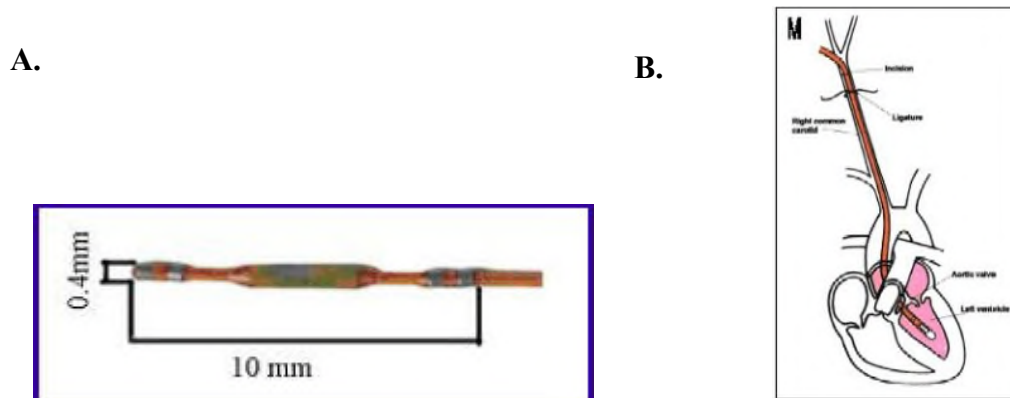


Figure 14 : A. Cathéter Millar 1.4F possédant des capteurs de pression et de conductance. B. Trajet parcouru par le cathéter depuis son introduction dans l'artère carotide droite jusqu'au ventricule gauche des souris.

15. Détection de CS dans le sang et la moelle de sujets sains mobilisés

15.1. Protocole de mobilisation

Les sujets volontaires sains reçoivent des injections sous-cutanées de G-CSF (Neupogen, Amgen) 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{jour}$ pendant 7 jours ou d'érythropoïétine (rHuEpo, Neorecormon, Roche) 5000 U/jour également pendant 7 J. Le sang est prélevé 1, 3, 6, 8 et 10 jours après le début du traitement. La ponction de moelle est réalisée aux J1 et J8 (Fig.15).



Figure 15 : Protocole d'injection, de prise de sang et de ponction de moelle pour les essais cliniques de détection de CS.

15.2. Analyse FACS des CSH, CSM et PE

Les cellules mononuclées de la MO et du sang, récupérées à la suite du gradient de densité, sont lavées dans du PBS et le surnageant est éliminé. Les marquages sont réalisés sur 1 à 2×10^6 cellules et commencent par une étape de blocage des sites non spécifiques par l'ajout de « FCR blocking reagent » (Miltenyi Biotech) pendant 30 min à 4°C . Cinq μl d'anticorps monoclonaux CD34 PE (IgG1 κ , BD Biosciences), CD45 Percp (IgG1, BD Biosciences), CD31 APC (PECAM, IgG1, R&D Systems), CD73 PE (SH3, SH4, IgG1 κ , BD Biosciences), CD90 APC (Thy-1, IgG1 κ , BD Biosciences), KDR APC (IgG1, R&D Systems), CD133 PE (IgG1, Miltenyi Biotech), CD3 FITC (IgG1, BD Biosciences), CD14 FITC (IgG2b, BD Biosciences), CD15 FITC (IgM, BD Biosciences), CD19 FITC (IgG1, BD Biosciences), et CD56 FITC (IgG2b, BD Biosciences) sont ajoutés au culot et les cellules sont incubées 30 min à 4°C . Les globules rouges résiduels sont éliminés au maximum à l'aide d'une solution de NH_4Cl appliquée 10 min : les cellules sont alors lavées et fixées dans du PBS contenant 1% de formaldéhyde. Les échantillons sont ensuite analysés à l'aide du FACSCANTO (BD Biosciences). Le canal de lecture du FITC constitue le « dump canal » ; toutes les cellules positives pour le CD3, CD14, CD15, CD19 et CD56 sont exclues de la suite des examens. Les combinaisons d'anticorps suivantes sont analysées : $\text{CD45}^+ \text{KDR}^+ \text{CD133}^+$: CSH ; $\text{CD45}^- \text{CD90}^+ \text{CD73}^+$: CSM ; $\text{CD45}^{\text{low}} \text{CD34}^+ \text{CD41}^+$: PE.

16. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. La distribution Gaussienne des populations est testée. Les comparaisons établies entre les groupes de souris sont réalisées en utilisant un test t de Student ou une analyse ANOVA. La reproductibilité inter-observateur est évaluée par une analyse Bland-Altman. La valeur de p est considérée statistiquement significative lorsqu'elle est <0.05 . Les données sur la survie des animaux sont analysées à l'aide de courbes Kaplan-Meier.

Résultats

Résultats Chapitre I

Isolation, caractérisation et différenciation des CSM humaines et murines en vue de leur utilisation en thérapie cellulaire cardiaque. Préparation de greffons de CSM afin d'évaluer leur capacité de régénération tissulaire cardiaque dans un modèle murin.

1.1. Objectifs du travail et méthodes

Notre laboratoire possède déjà l'expérience requise relative à la sélection et la culture *ex vivo* de CSH. Par contre, la première étape de ce travail a consisté à mettre au point les conditions d'isolement et d'expansion *ex vivo* des CSM. Brièvement, les cellules mononuclées de moelle osseuse de souris transgéniques pour le gène codant pour l'eGFP et de moelle osseuse de donneurs volontaires sont isolées par gradient de densité. Elles sont cultivées *ex vivo* dans un milieu complet approprié, avec entretiens successifs de la fraction adhérente et épuisement progressif des cellules non adhérentes. Le nombre de semaines en culture *ex vivo* et de passages sont déterminés afin d'amplifier les CSM à un haut degré de pureté.

L'expansion des CSM sera évaluée selon différents paramètres :

- a) Enumération de la fraction adhérente et analyse du cycle cellulaire.
- b) Analyse du phénotype des cellules cultivées *ex vivo* par cytométrie en flux.
- c) Evaluation de la richesse en progéniteurs CFU-F.
- d) Différenciation fonctionnelle des CSM *in vitro*.

Nous désirons vérifier si les CSM amplifiées *ex vivo* ont toujours la capacité de se différencier *in vitro* en cardiomyocytes. Pour cela, le milieu de culture de différenciation est supplémenté de 5-azacytidine et la mise en évidence de protéines propres au muscle cardiaque, telles que l'alpha-actine et la connexine 43, est obtenue par méthode immunohistochimique. Le phénotype de ces cellules ainsi que leur capacité clonogénique et de différenciation, sont évalués de façon similaire aux CSM indifférenciées.

Afin de déterminer la capacité des CSM à participer aux phénomènes de réparation tissulaire cardiaque, nous devons être en mesure de les détecter après qu'elles aient été injectées. C'est pourquoi, nous avons ensuite vérifié l'expression de la GFP dans les CSMm isolées à partir d'une lignée de souris transgéniques exprimant ubiquitairement ce fluorochrome.

1.2. Résultats

1.2.1. Isolement et expansion de CSM humaines et murines *in vitro*

L'adhésion primaire des cellules mononucléées humaines dépend du lot de FBS utilisé (Fig16A.). De plus, une meilleure amplification cellulaire est obtenue dans le milieu MSCGM par rapport au milieu DMEM-LG supplémenté par 10% du FBS, quel qu'en soit le lot. Une densité cellulaire de 500.000 cellules par cm^2 à partir des cellules de moelle et de 5.000 cellules par cm^2 pour les passages ultérieurs permet une multiplication cellulaire optimale.

Les CSM (Fig 16B.) sont plus difficiles à isoler et à amplifier que les CSM humaines. Nous avons dû tester différents milieux de culture et définir la composition optimale et la densité cellulaire requises pour obtenir une bonne expansion des CSM murines. Le milieu idéal consiste en du DMEM avec 10% FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine. Quant à la densité cellulaire optimale, elle est de 800.000 cellules/ cm^2 à partir des cellules de moelle, de 40.000 cellules/ cm^2 aux passages 1 à 5 et de 10.000 à partir du 6^{ème} passage. Les passages successifs assurent l'entretien de la fraction adhérente et l'épuisement progressif des cellules non adhérentes. Au 7^{ème} passage, les CSM seront amplifiées à un haut degré de pureté.

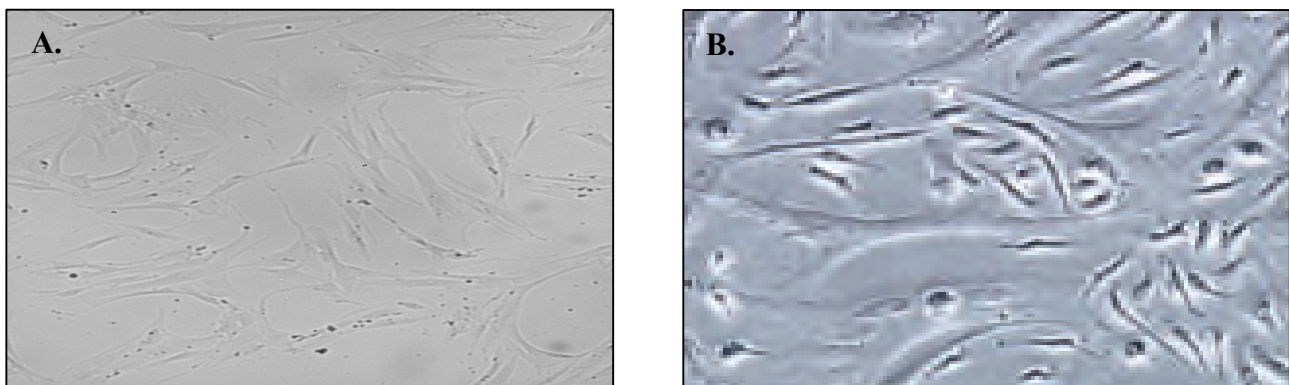


Figure 16 : A. CSM humaines cultivées dans du MSCGM et B. CSM murines cultivées dans du DMEM+10% FBS à un grossissement de 40 X.

Une courbe de croissance a pu être tracée et le temps de doublement calculé est de 8 jours (Fig. 17A). Aucune phase de décroissance ne peut être observée jusqu'au 15^{ème} passage, ce qui se rapproche des courbes de croissance observées pour les lignées continues. Nous avons également comparé la croissance des CSM cultivées à une densité cellulaire élevée ou faible (Fig. 17B et C) et avons pu constater que le meilleur rendement d'amplification est obtenu pour les concentrations cellulaires les plus élevées.

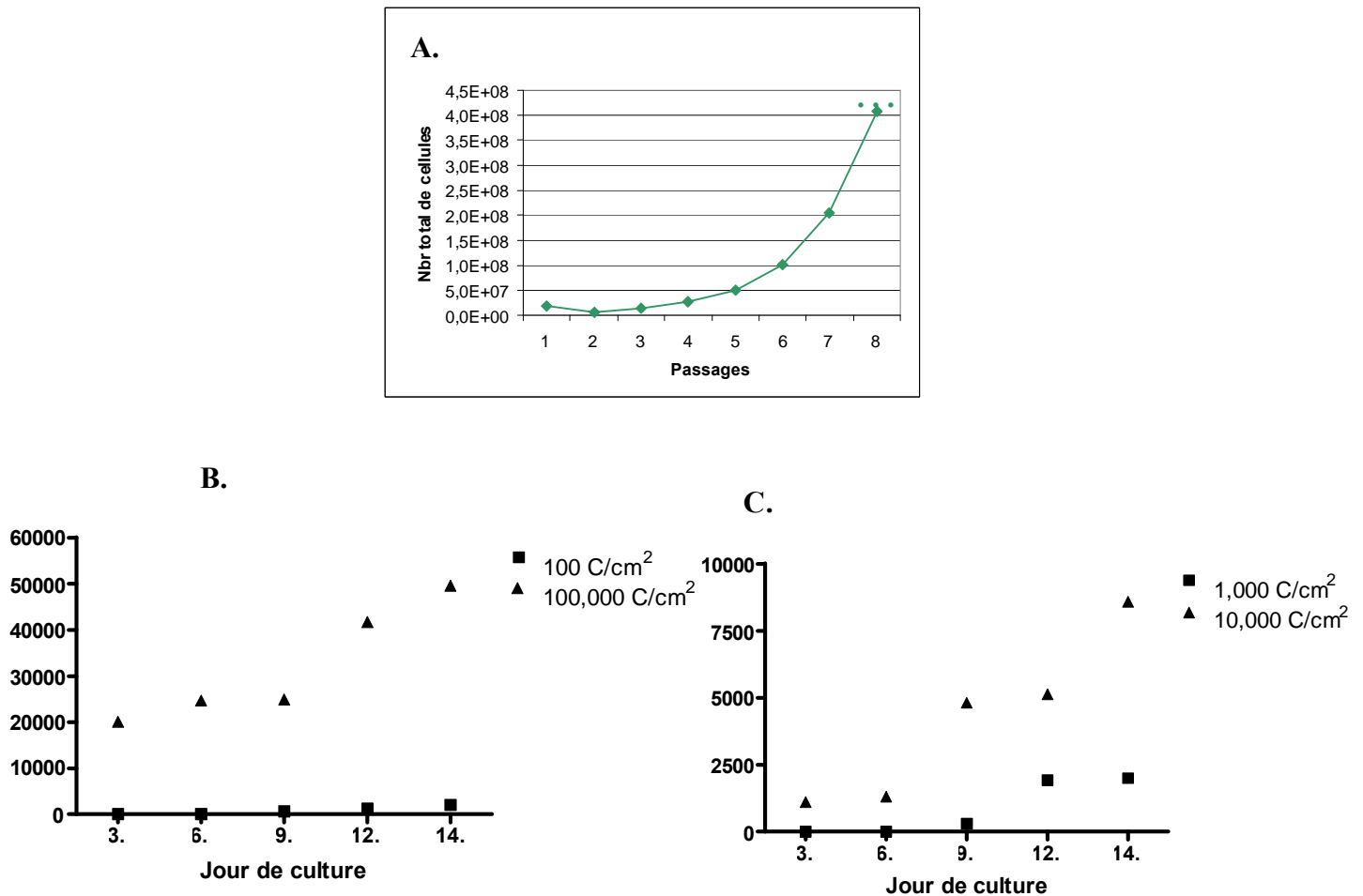


Figure 17 : A. Courbe de croissance obtenue au cours des passages successifs des CSM murines. B. Courbe de croissance obtenue en P1 pour des densités cellulaires de 100 et 100.000 cellules/cm². C. Courbe de croissance obtenue en P3 pour des densités cellulaires de 1.000 et 10.000 cellules/cm².

1.2.2. Analyse des CSM par cytométrie de flux

D'un point de vue morphologique, nous avons pu constater, lors des passages des CSM au FACS, l'apparition d'une population cellulaire de grande taille, de haute densité et non présente immédiatement dans la moelle. Il a effectivement été reporté que les CSM ont une morphologie particulière et qu'il est possible de les isoler d'après le seul critère de la taille. Nous avons appelé cette population supérieure, population de CSM FSC^{high} SSC^{high} (Fig. 18). C'est pourquoi, lors de nos analyses du phénotype en cytométrie de flux, nous

enregistrons les résultats pour l'ensemble des cellules, mais également, pour la population $FSC^{high} SSC^{high}$ et avons observé qu'elle présente plus rapidement le phénotype attendu pour les CSM (Tableau 4).

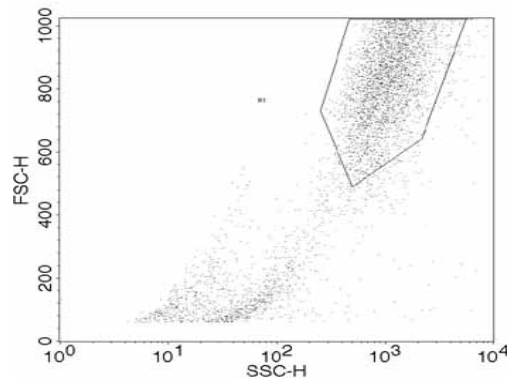


Figure 18 : Analyse par FACS de la population de CSMm $FSC^{high} SSC^{high}$. FSC est un paramètre représentant la taille des cellules et SSC la granularité.

Nous avons ensuite analysé le phénotype des cellules mononuclées de la moelle humaine par cytométrie de flux (Tableau 4). Les cellules sont négatives pour les antigènes CD34, CD80, CD105, CD73 et CD90. Les antigènes HLA-I et -II présentent respectivement une positivité de 71.9% et 22.33%. Les cellules mononuclées de la moelle sont également positives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45 (77.0%) et CD31 (39.8%). Au deuxième passage, nous obtenons déjà le phénotype décrit pour les CSM humaines. En effet, on peut observer que les antigènes attendus négatifs le sont effectivement (CD31, CD34, CD45, CD80, HLA-DR), alors que les antigènes HLA-1, CD73, CD90 et CD105 sont fortement positifs.

Tableau 4 : Etude de l'expression des antigènes de surface des cellules mononuclées de la MO et des CSM humaines en culture après 2 passages (P), dans la population totale ou dans la population de CSMm $FSC^{high} SSC^{high}$.

	P0	P2 Population totale	P2 $FSC^{high} SSC^{high}$
Marqueurs hématopoïétiques			
CD34	4.7%	0.9%	0.2%
CD45	77.0%	0.9%	0.2%
Marqueurs endothéliaux			
CD31 (PECAM)	39.8%	1.9%	1.8%
CD90 (Thy1)	0.0%	92.2%	92.8%
Marqueurs spécifiques CSM			
HLA-1	71.9%	79.3%	92.6%
CD73	0.0%	84.5%	92.8
CD105	0.0%	71.1%	83.6%
Autres marqueurs			
CD80	4.0%	0.0%	0.0%
HLA-DR	22.3%	0.5%	0.0%

En étudiant l'expression de différents antigènes à la surface des cellules de la moelle murine ainsi qu'au cours des différents passages des CSM de souris en culture, nous pouvons observer que l'expression des marqueurs CD45 et 11b (Fig. 19A.) est élevée dans la moelle et diminue fortement au fur et à mesure des passages, jusqu'à être inférieure à 5%. L'antigène CD34 (Fig. 19A.) quant à lui, reste faiblement exprimé tout au long des passages. Les antigènes CD106 et Sca-1 (Fig. 19B.) sont très faiblement détectés dans la moelle et augmentent fortement, jusqu'à plus de 95% au 8^{ème} passage dans la population supérieure. Ce phénotype correspond à l'expression des antigènes attendus pour les CSM murines. Le tableau 5 résume l'ensemble des antigènes analysés pour caractériser les CSM humaines et murines.

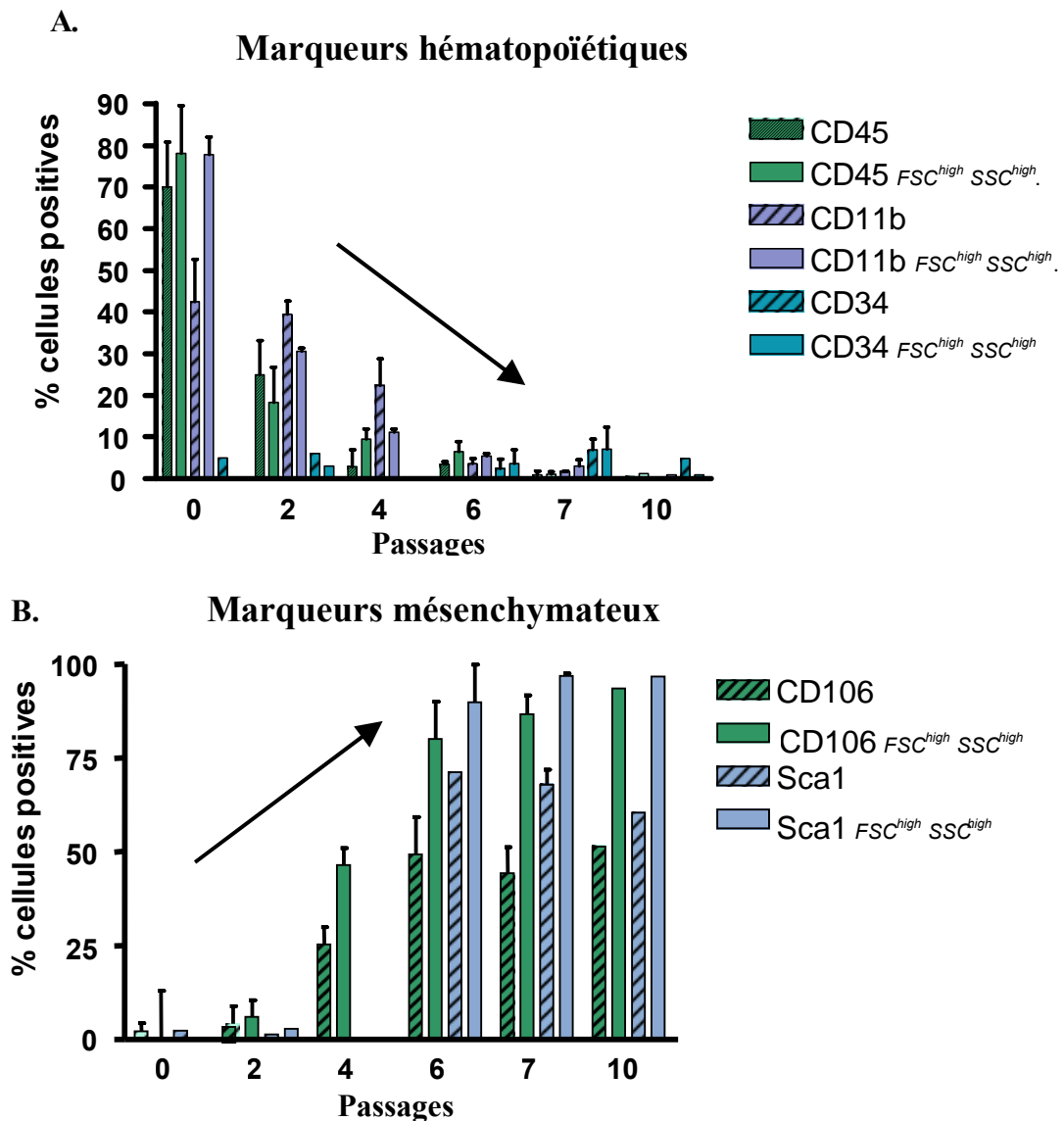


Figure 19 : Evolution de l'expression **A.** des antigènes attendus négatifs chez les CSM murines et **B.** des antigènes attendus positifs chez les CSM murines, pour l'ensemble des cellules et pour la population *FSC^{high} SSC^{high}*.

Tableau 5 : Résumé des antigènes de surface étudiés et du phénotype des CSM humaines et murines.

	Souris	Humain
Marqueurs hématopoïétiques		
CD34	+	-
CD45	-	-
CD11b	-	
Sca-1 (Iy-6A/E)	+++	
CD106 (VECAM-1)	+++	
Marqueurs endothéliaux		
CD31 (PECAM)		-
CD90 (Thy1)		+++
Marqueurs spécifiques CSM		
HLA-1		+++
CD73		+++
CD105		++
Autres marqueurs		
CD80		-
HLA-DR		-

1.2.3. Evaluation de la fréquence en progéniteurs CFU-F et CFUF-IC

Deux méthodes objectives de quantification de la fréquence des CSM sont également réalisées et permettent d'évaluer la capacité proliférative et la présence de progéniteurs des CSM cultivées *in vitro*.

La première permet d'évaluer la richesse en progéniteurs CFU-F (« Colony-Forming Unit-Fibroblast ») à l'aide d'une méthode qui consiste en une culture secondaire en milieu liquide optimisé pour le développement de colonies d'origine mésenchymateuse. Lors de la réalisation de ces tests de CFU-F, classiquement utilisés pour évaluer les cultures de CSM, nous n'avons pas systématiquement obtenu une relation linéaire entre le nombre de cellulesensemencées et le nombre de colonies dénombrées. Une augmentation de la fréquence des CSM au cours des passages successifs est observée (Fig. 20A. et B.). La fréquence de CFU-F formées à partir de cellules mononuclées isolées directement de la moelle de souris eGFP⁺ est de 2.10×10^{-4} , puis augmente à 2.81×10^{-3} pour les CFU-F formées à partir de cellules au premier passage, 9.77×10^{-3} au deuxième passage, 1.35×10^{-2} au troisième passage, 7.35×10^{-3} au quatrième passage, 1.2×10^{-2} au cinquième passage, 5.38×10^{-2} au sixième passage, 1.36×10^{-1} au septième passage, 1.35×10^{-1} au huitième et 1.76×10^{-1} au neuvième passage.

Quant à la fréquence de CFU-F formées à partir de cellules mononuclées isolées directement de la moelle primaire humaine, elle est de 9.69×10^{-5} puis augmente à 1.67×10^{-4} au premier passage, à 4.2×10^{-1} au second passage et à 1.27 au troisième passage.

Nous avons ensuite analysé le phénotype des cellules formant les CFU-F en cytométrie de flux. Aussi bien pour les CSM humaines que murines, nous avons obtenu le même phénotype que celui des CSM purifiées, avec toutefois, une diminution de l'expression des antigènes exprimés, suggérant une différenciation fibroblastique des cellules.

La seconde méthode consiste en la réalisation de dilutions limites de CSM mises en culture dans des plaques 96 puits. On peut également constater un enrichissement en CSM (Fig. 20C et D.). La fréquence de CSM dans la moelle de souris eGFP+ est de 1/513,936, puis, augmente à 1/18,806 au 1^{er} passage, 1/7,276 au 2^{ème} passage, 1/1,957 au 3^{ème} passage, 1/1,451 au 4^{ème} passage, 1/246 au 5^{ème} passage, 1/200 au 6^{ème} passage, 1/190 au 7^{ème} passage, 1/160 au 8^{ème} passage et 1/165 au 9^{ème} passage. Le nombre de CFU-Fm formées à chaque passage en fonction du nombre de CFU-ICm est de 10.7 ± 2.7 . Cette valeur reste constante pour chaque passage.

Quant à la fréquence de CSM humaines, elle est de 1/30,125 pour la moelle primaire, 1/1,236 au 2^{ème} passage et de 1/131 au 3^{ème} passage, avant de décroître aux passages ultérieurs. Le nombre de CFU-Fh formées à chaque passage, en fonction du nombre de CFU-ICH, est de 9.6 ± 1.9 . Cette valeur reste constante pour chaque passage.

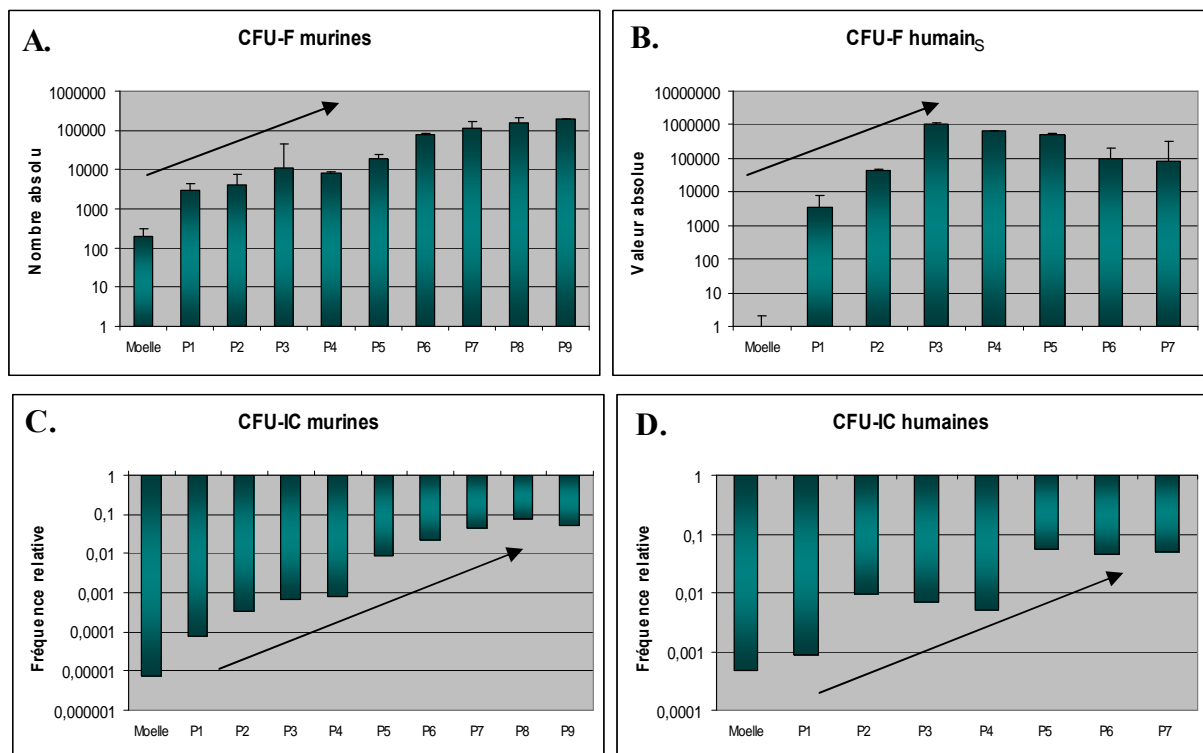
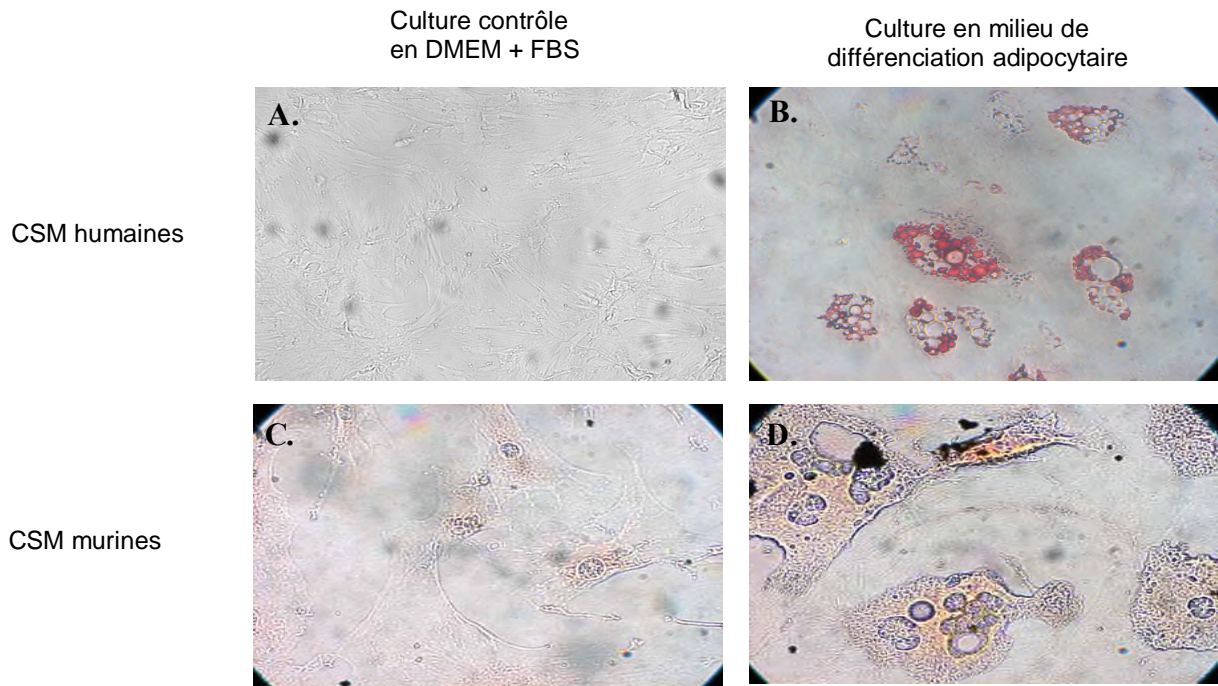


Figure 20 : A. Nombre de CFU-F formées par passage (P) pour les CSM murines et B. pour les CSM humaines C. Fréquence relative en progéniteurs à chaque passage, évaluée par des tests de CFU-IC sur des CSM murines et D. sur des CSM humaines.

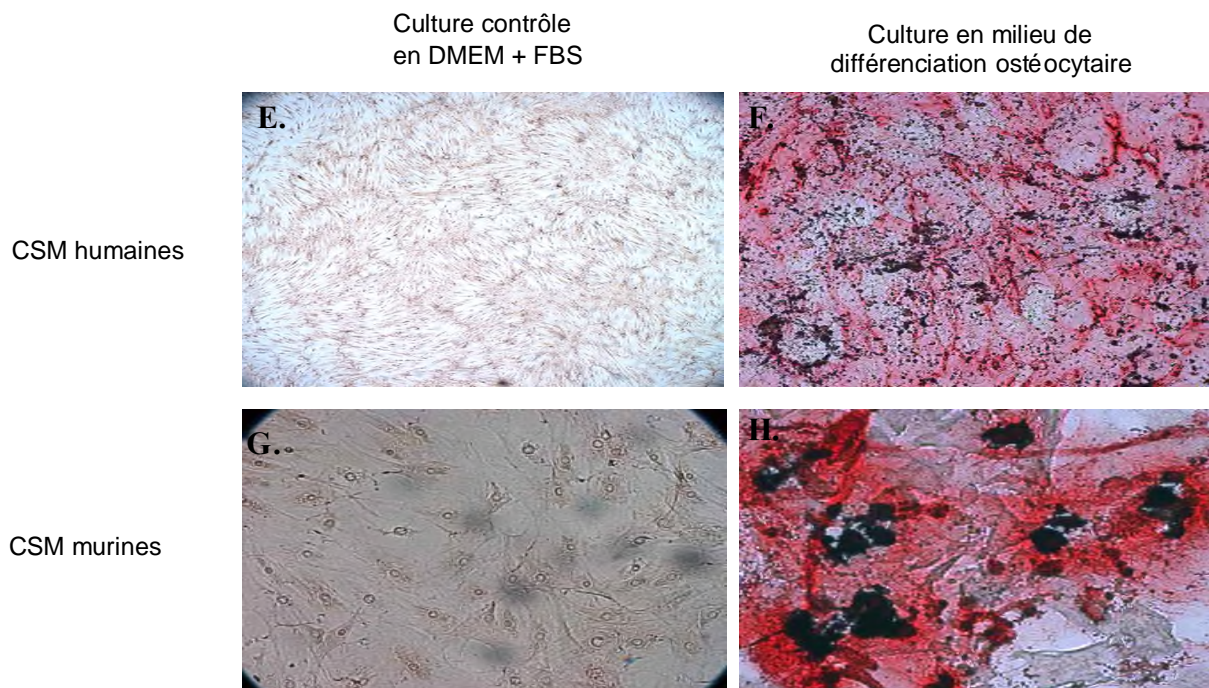
1.2.4. Différenciation fonctionnelle des CSM *in vitro*

Nous avons évalué le potentiel des CSM à se différencier en trois tissus d'origine mésodermique. Les CSM humaines, ainsi que les CSM de souris transgéniques pour l'eGFP, se différencient en adipocytes (Fig. 21B et D), ostéocytes (Fig. 21F et H) et chondrocytes (Fig. 21J et L). Lorsque les CSM sont placées dans le milieu de différenciation chondrocytaire, elles s'organisent en micro-masse et produisent des protéoglycans colorés en mauve par la Toluidine bleue (Fig. 21L.).

Adipogenèse



Coloration: Oil Red O
Ostéogenèse



Coloration: Alizarin Red

Chondrogenèse

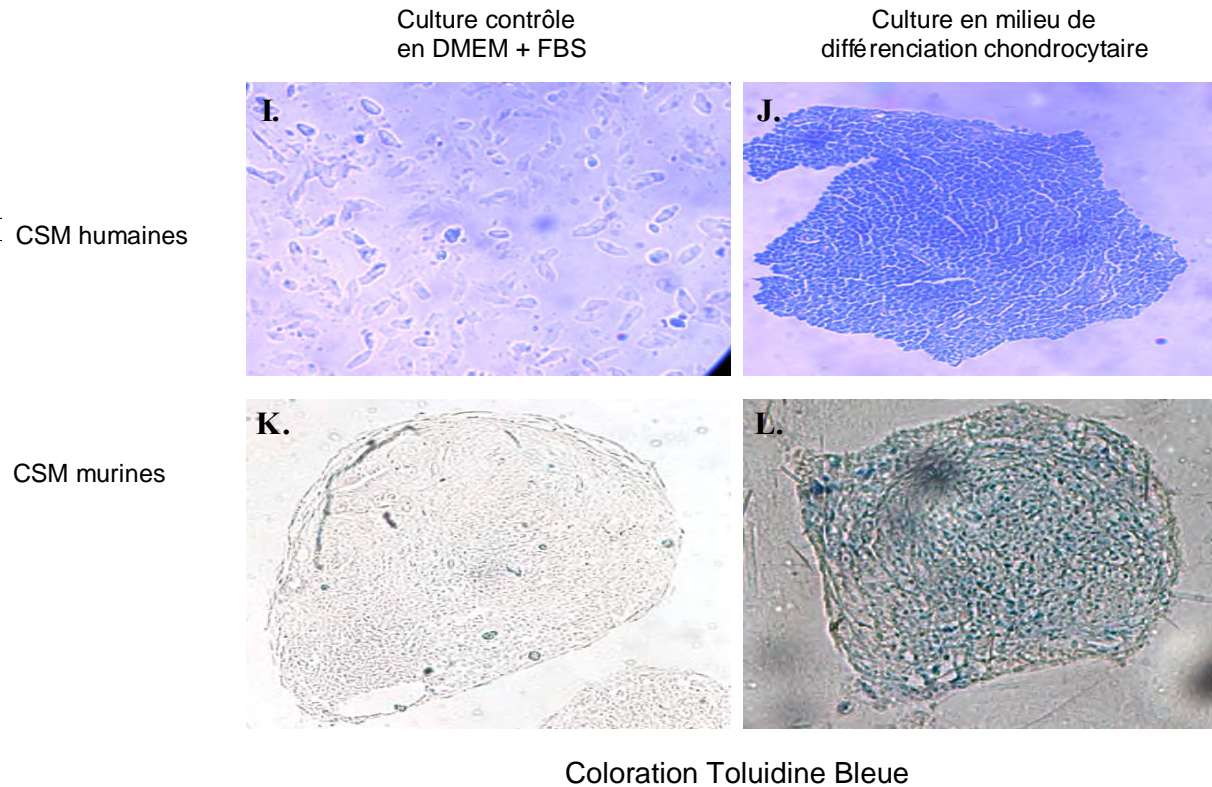


Figure 21 : Différenciation des CSM humaines au 3^{ème} passage et murines au 7^{ème} passage. **A.** et **C.** Culture contrôle incubée dans du DMEM+10%FBS et coloré à « l'Alizarine Red », **B.** et **D.** Induction de la différenciation ostéocytaire colorée à « l'Alizarine Red », **E.** et **G.** Culture contrôle incubée dans du DMEM+10%FBS colorée à « l'Oil Red O », **F.** et **H.** Induction de la différenciation adipocytaire colorée à « l'Oil Red O », **I.** et **K.** Culture contrôle incubée dans du DMEM+10%FBS et coloré à la « toluidine bleue », **J.** et **L.** Induction de la différenciation chondrocytaire colorée la « toluidine bleue ».

1.2.5. Analyse du cycle cellulaire des CS

Nous avons analysé en cytométrie de flux, après coloration au Hoechst 33342, le cycle cellulaire des CSM humaines et murines ainsi que des cellules CD34⁺ isolées à partir de sang de cordon ombilical. En effet, le cycle cellulaire peut avoir un impact sur la capacité des cellules à migrer et à s'implanter dans la moelle et dans d'autres tissus, dont le cœur. Pour les CSM récupérées à 85% de confluence, nous trouvons, à chaque passage, 89% de cellules en G0/G1. En ce qui concerne l'analyse des CD34⁺, 96% des cellules sont en G0/G1 quand elles sont fraîchement isolées, et ce résultat diminue à 65% après une culture à court terme en présence de SCF, TPO et Flt3, et à 61% quand de l'IL-6 et du G-CSF sont rajoutés à la combinaison précédente de cytokines (Fig. 22). Ces résultats ont été validés par l'analyse du cycle cellulaire par coloration à l'Iodure de Propidium : des résultats similaires ont été obtenus.

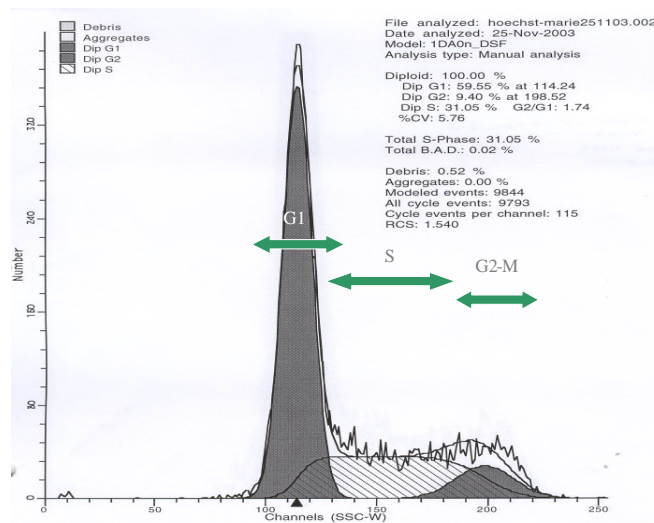


Figure 22 : Analyse par cytométrie de flux du contenu en ADN après coloration de CSH par du Hoechst 33342.

1.2.6. Différenciation cardiomyocytaire des CSM amplifiées *in vitro*

Nous avons vérifié que les CSM humaines et murines, amplifiées *ex vivo*, possèdent toujours la capacité de se différencier *in vitro* en cardiomyocytes. Pour ce faire, il a été nécessaire de mettre au point des techniques d'histologie et d'immunohistologie qui permettront également d'analyser la régénération tissulaire cardiaque, après greffes de cellules souches dans le modèle animal d'IM. Un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD31 nous permet de mettre en évidence l'angiogenèse ; deux anticorps dirigés contre l' α actinine et la connexine 43 marquent les cardiomyocytes de façon spécifique. La connexine 43 permettra plus précisément de mettre en évidence les connexions entre cellules cardiaques.

L'antigène CD31 et l' α actinine ne sont pas exprimés par les CSM. Par contre, nous pouvons constater un marquage des CSM par l'anticorps anti-connexine. Toutefois, ce marquage est diffus, généralisé à l'ensemble de la cellule et ne montre pas une organisation comparable à celle observée sur les coupes de cœur de souris (voir chapitre II).

Pour obtenir la différenciation des CSM en cardiomyocytes, le milieu de culture a été supplémenté de 5-azacytidine. Nous avons constaté qu'après induction de la différenciation, la morphologie des cellules était modifiée. Au départ de cellules à l'aspect fibroblastique, nous obtenons des cellules rondes. Toutefois, ce changement ne concerne que 55 à 70% des cellules cultivées. Nous avons ensuite caractérisé ces cellules. Le phénotype des CSM n'est pas modifié par le traitement à la 5-azacytidine et nous constatons que le nombre de CFU-F formées diminue de $1.8 \times 10^6 \pm 4 \times 10^5$ pour les CSM indifférenciées à $4 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$ après

différenciation. Nous avons observé que les CSM différenciées en cardiomyocytes possédaient une capacité de différenciation en ostéoblastes diminuée et en adipocytes augmentée (Fig. 23).

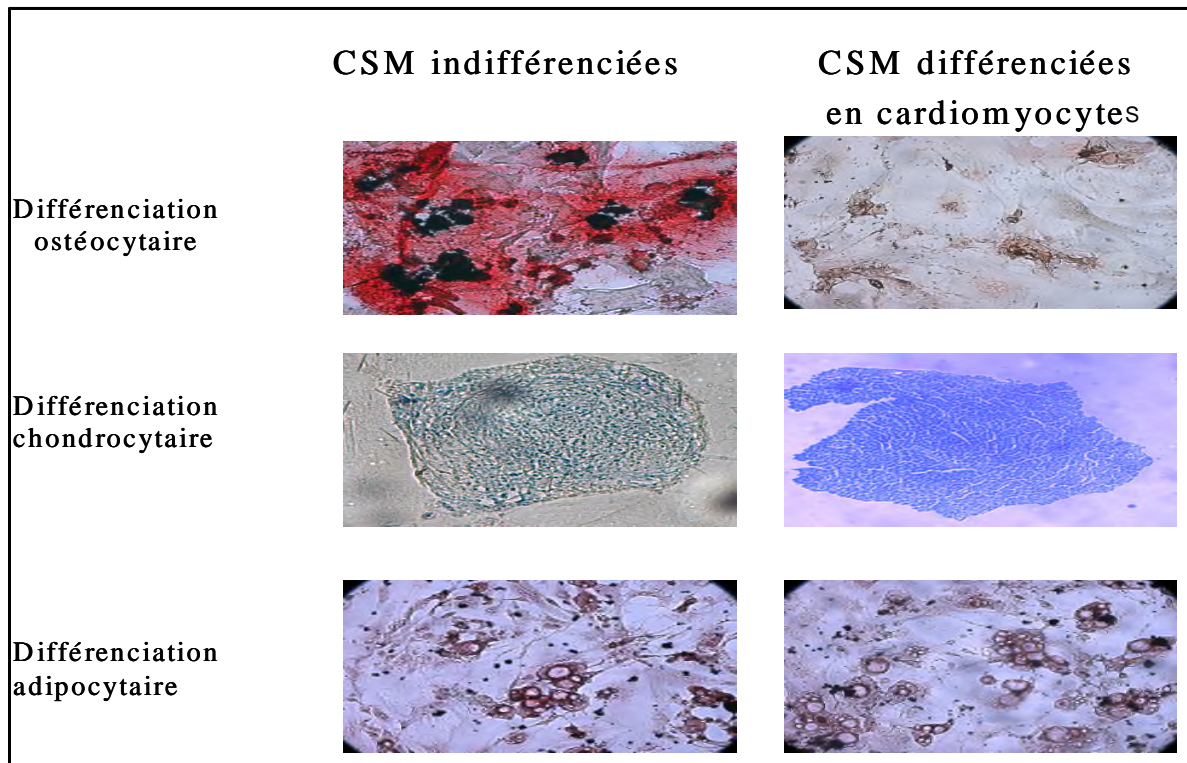


Figure 23 : Comparaison de la capacité des CSM indifférenciées ou traitées par du 5-azacytidine à se différencier en ostéocytes (coloration à l' « Alizarin Red »), chondrocytes (coloration au « toluidine bleue ») et adipocytes (coloration à l' « Oil Red O »).

Enfin, nous avons remarqué, qu'après induction de la différenciation, les CSM n'expriment toujours pas le CD31, mais que, par contre, elles expriment faiblement l' α actinine. Il existe également une réorganisation de la distribution de la connexine 43 qui se localise alors de façon ponctuelle à la périphérie des cellules (Fig. 24).

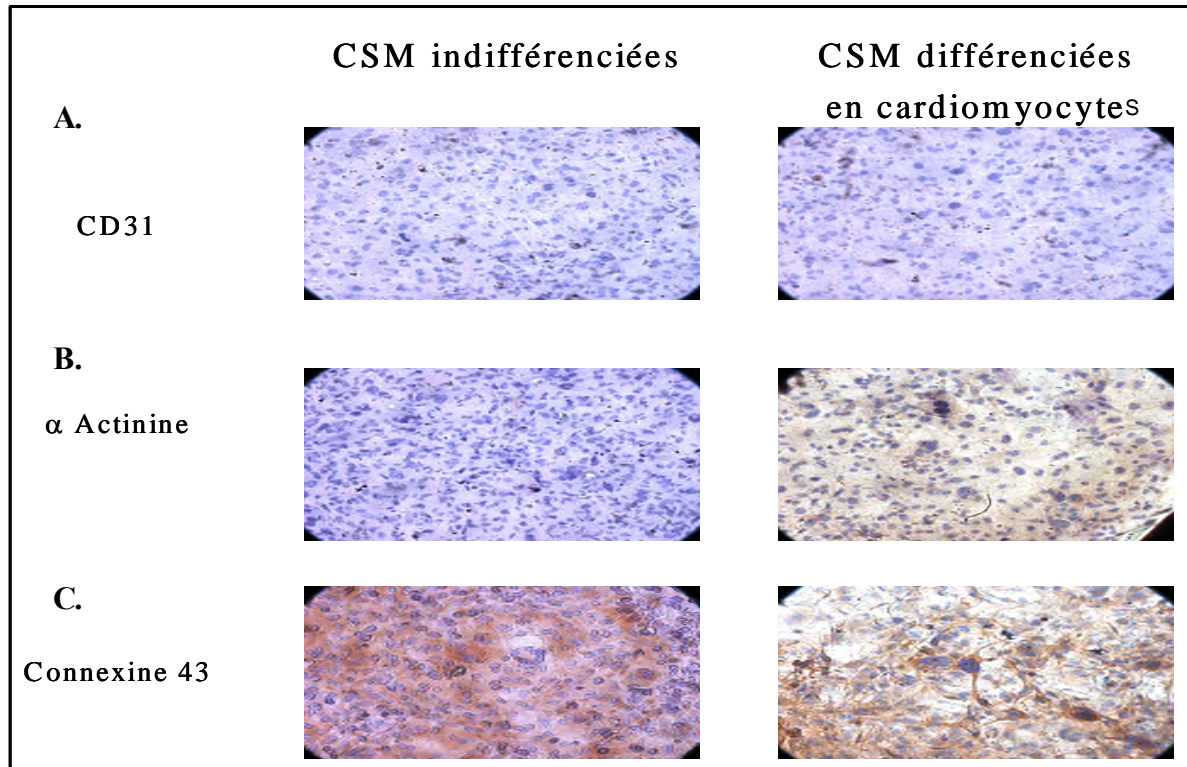


Figure 24: Immunohistochimie de CSMm au 6^{ème} passage (grossissement 50 X) **A.** Anticorps anti-CD31. **B.** Anticorps anti- α -actinine. **C.** Anticorps anti-connexine 43.

Nous avons poursuivi l'analyse des CSM différenciées en cardiomyocytes par la mesure du calcium intracellulaire et constaté un taux de base significativement plus élevé que dans les CSM indifférenciées. Nous avons ensuite mené les flux de calcium en réponse à du KCl 5mM. Nous avons enregistré une variation de la concentration en Ca^{++} , aussi bien dans les CSM indifférenciées que différenciées mais la concentration en Ca^{++} des cardiomyocytes est nettement supérieure (Fig. 25). De plus, les CSM exposées à la 5-azacytidine présentent une force de contraction supérieure à celle des CSM non exposées (Fig. 26).

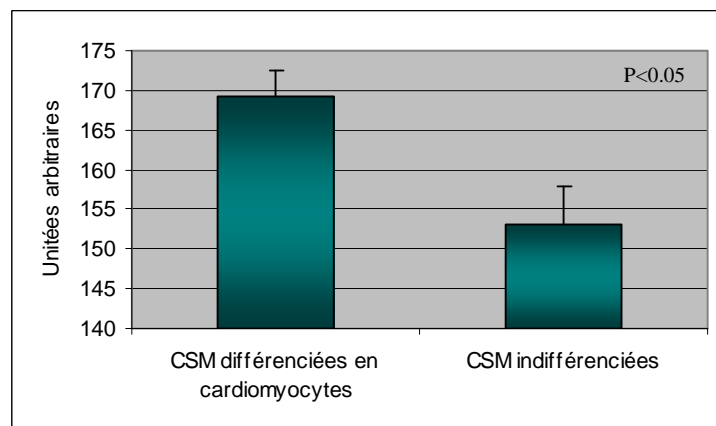


Figure 25 : Taux de calcium dans les CSMm avant et après différenciation par de la 5-azacytidine.

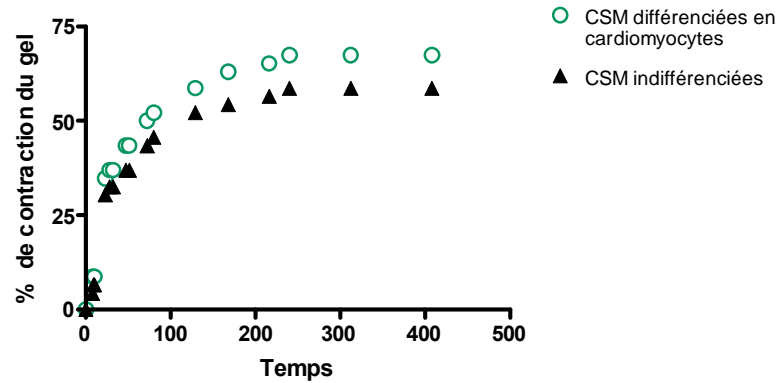


Figure 26 : Force de contraction des CSMm avant et après différenciation par de la 5-azacytidine.

Enfin, nous avons terminé la caractérisation des CSM humaines et murines différenciées en cardiomyocytes par l'analyse de l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans la régulation du cycle cellulaire mais également dans des voies de différenciation (Fig 27). Nous avons dosé STAT3 qui intervient dans la prolifération et est activé notamment dans les CS en cycle, Oct-4 qui est un marqueur de pluripotentialité, p53 qui intervient dans l'apoptose, C/EBP β et PPAR γ qui sont des marqueurs adipogéniques, CBF α 1 qui est un marqueur ostéogénique, GATA-4 un marqueur cardiogénique, MEF2 et MyoD qui sont deux marqueurs de la lignée myogénique, HNF-1 α / β et HNF-3 α qui sont deux marqueurs hépatiques et pancréatiques.

Dans les CSMh indifférenciées, nous avons pu détecter que MEF2, et ce à de très faibles quantités. Après un traitement par de la 5-azacytidine, en plus de MEF2, nous pouvons détecter C/EBP β , P53, STAT3 et CBF α 1. La concentration de ces facteurs de transcription varie en fonction de la durée du traitement par la 5-azacytidine. Dans les CSMm, MEF2, ainsi que C/EBP β et CBF α 1, sont déjà exprimés à l'état indifférencié. Après la différenciation, en plus de ces 3 facteurs de transcription, les CSMm expriment également STAT3 et p53.

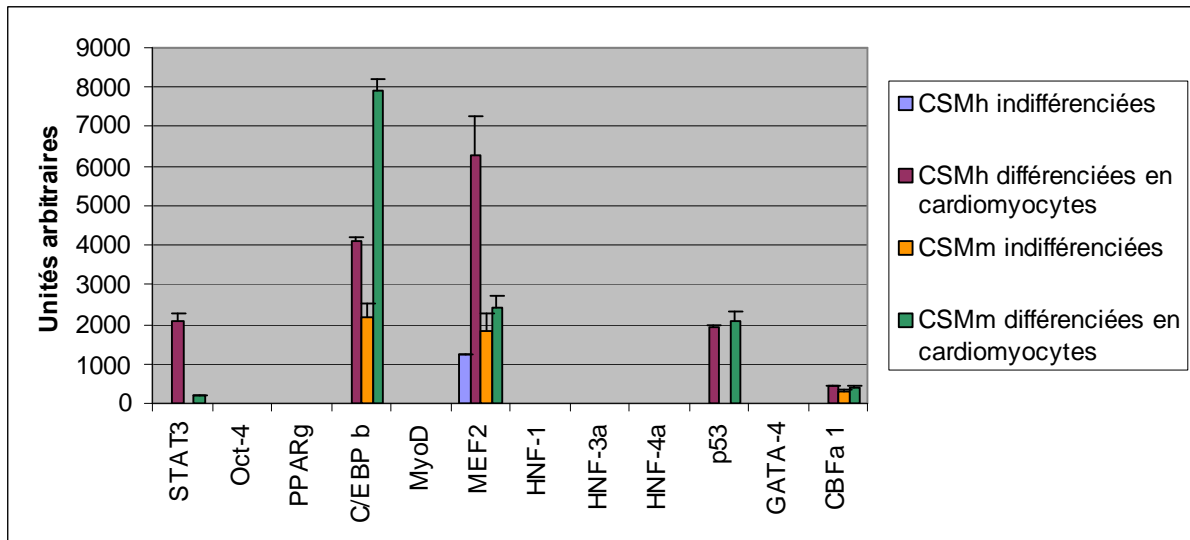


Figure 27 : Etude de l'expression de facteurs de transcription dans les CSM humaines et murines avant et après différenciation par de la 5-azacytidine.

1.2.7. Etude de l'expression de la GFP dans les cellules de la moelle de souris transgénique EGFP+

De nombreuses recherches se font sur la transplantation de CS grâce à des souris transgéniques exprimant ubiquitairement la protéine fluorescente « green fluorescent protein » (GFP). L'expression de cette protéine est considérée comme homogène dans toutes les cellules murines, à l'exception des érythrocytes et des poils. Cependant, avant de réaliser des greffes de CSH et CSM isolées de ces souris (C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J, souche 003291) dans notre modèle murin d'IM, nous devons vérifier l'expression de l'eGFP afin d'être sûrs d'identifier facilement, par fluorescence, toutes les cellules provenant du donneur qui pourraient participer à un phénomène de réparation tissulaire cardiaque. C'est pourquoi, nous avons tout d'abord examiné les cellules au microscope confocal à fluorescence (Fig. 28A.) et avons pu observer que toutes les cellules ne sont pas fluorescentes.

Afin de quantifier ces résultats, nous avons analysé par cytométrie de flux l'expression de l'eGFP dans les cellules de la moelle de souris C57Bl/6 EGFP+, ainsi qu'au cours des différents passages des CSM cultivées *in vitro*. Nous avons ainsi calculé que seuls 30% des cellules sont fluorescentes dans la moelle de souris transgéniques ainsi que dans les cultures de CSM, du 1^{er} au 5^{ème} passage. Ensuite, le pourcentage de cellules fluorescentes augmente jusqu'à plus de 90% et est corrélé avec l'apparition d'une population pure de CSM CD106⁺, Sca-1⁺, CD45⁻ et CD11b (Fig. 28B.). Lors de l'observation au microscope confocal à fluorescence, nous avons également constaté que 100% des CFU-F formées à partir de CSMm eGFP+ sont fluorescentes. Nous pouvons donc supposer que les progéniteurs sont

fluorescents et transmettent le gène codant l'eGFP à leur descendance. Toutefois, après l'induction de la différenciation en ostéocytes, adipocytes, chondrocytes ou cardiomyocytes, les cellules ainsi cultivées ne sont plus fluorescentes.

Des études réalisées précédemment dans notre laboratoire ont démontré que dans la moelle osseuse, 84% des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques Sca-1+, cKit+ et lin- expriment l'eGFP, mais que cette fluorescence diminue à 65% dans les progéniteurs Sca-1+, cKit+ et Lin+ ($p=0.014$). Dans le sang périphérique, l'expression totale de l'eGFP est beaucoup plus faible que dans la moelle. Contrairement à ce que nous avons observé pour les CSM, lorsqu'une évaluation clonogénique de ces précurseurs hématopoïétiques eGFP+ est réalisée, seuls 34% des colonies formées sont fluorescentes. Le taux d'apoptose n'étant pas plus élevé dans les cellules eGFP+, cette perte de fluorescence est davantage due à une inhibition de l'expression dans les cellules différenciées. De plus, la fluorescence est, soit présente, soit totalement absente des cellules, ce qui suggérerait une suppression complète de l'expression du transgène dans les cellules en division plus qu'une augmentation graduelle de la dégradation de l'eGFP.

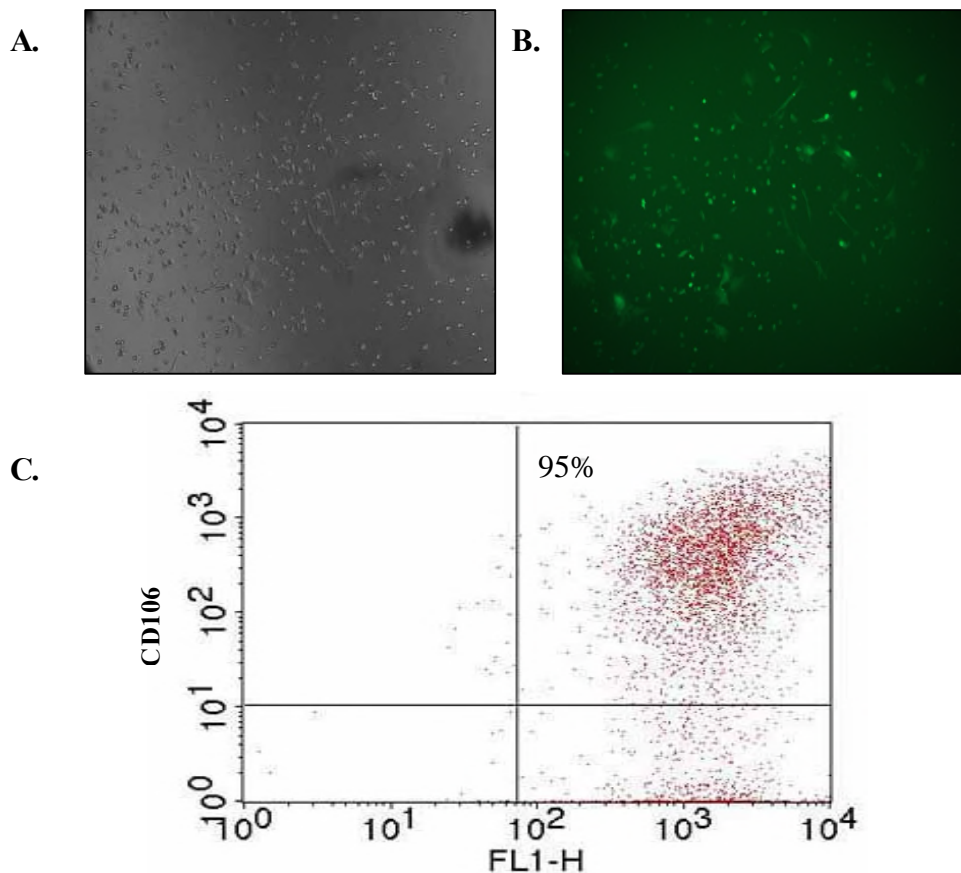


Figure 28: Visualisation au microscope confocal de CSM isolées au 3^{ème} passage, à partir de souris C57Bl/6 eGFP+, **A.** en lumière visible et **B.** en fluorescence **C.** Analyse par cytométrie de flux de l'expression de l'eGFP et de l'antigène CD106 dans des CSM isolées au 8^{ème} passage à partir de souris C57Bl/6 eGFP+.

D'autre part, nous voudrions également évaluer le potentiel de greffons de CSMh à améliorer la reconstitution du muscle cardiaque après ischémie. Afin de suivre facilement toutes les cellules humaines, injectée dans notre modèle animal, nous avons transduit les CSMh à l'aide d'un vecteur lentiviral contenant le gène de l'eGFP. Nous obtenons un rendement de plus de 90% de cellules exprimant le fluorochrome et avons adapté ce protocole pour les CSMm afin d'assurer que toutes les cellules greffées soient fluorescentes. Cependant, les cellules murines étant beaucoup moins permissives, nous obtenons un rendement de transduction beaucoup plus faible. Une étape de tri des cellules fluorescentes par cytométrie de flux est donc un préalable nécessaire à la greffe d'une population homogène de cellules murines fluorescentes.

1.3. Discussion

Des populations de CS très primitives sont présentes chez l'individu adulte et sont capables de régénérer le tissu spécifique dans lequel elles sont principalement localisées. Certaines de ces CS peuvent également se transdifférencier en tissus différents lorsqu'elles sont mobilisées via le sang ou placées directement dans l'environnement adéquat. Des cellules indifférenciées du stroma médullaire sont par exemple, capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et plus curieusement en certaines cellules non observables dans la moelle, comme des myéloblastes ou des myotubes²⁰³. Ainsi est née la notion de CS mésenchymateuses (CSM), présentes dans la moelle osseuse et capables, soit de se répliquer sous forme de cellules multipotentes indifférenciées, soit de se différencier en une variété de tissus non-hématopoïétiques d'origine mésodermique, comme de l'os, du cartilage, du tendon, de graisse, du muscle squelettique, du muscle cardiaque et du stroma médullaire²⁰⁴. Ces observations suscitent des espoirs importants dans le domaine de la thérapie cellulaire et plus particulièrement en matière de réparation cardiaque.

Les recherches menées sur les CS soulèvent un nombre appréciable de questions. Bien que les méthodes de prélèvement, de purification et de culture des CSH soient maintenant au point, on ne connaît pas encore la nature ni le phénotype des cellules d'origine médullaire, de type CSH ou de type CSM, impliquées dans les phénomènes de réparation cardiaque par transdifférenciation. Les méthodes idéales de prélèvement, sélection, amplification et transplantation de ces cellules à potentialité réparatrice restent également mal définies.

La première partie de ce travail a consisté à mettre au point les conditions d'expansion *ex vivo* des CSM. L'objectif étant de pouvoir préparer des greffons homogènes de CSM parfaitement caractérisées, une amplification cellulaire importante est requise. Nous avons déterminé la composition des milieux de culture spécifiques permettant d'obtenir un bon rendement d'amplification des CSM humaines et murines. Nous avons pu constater que la croissance des CSM est fortement influencée par la densité cellulaire, mais également par le type de sérum utilisé pour supplémenter le milieu.

Pour passer ultérieurement à de la thérapie cellulaire chez l'homme, l'utilisation de sérum d'origine animale semble peu adéquate. De plus, les contaminations par des protéines xénogéniques pourraient provoquer des réactions immunes au niveau du site d'injection dans le muscle cardiaque. Les conditions d'expansion *ex vivo* devront donc être adaptées. Afin de remplacer les sérums d'origine animale pour l'expansion des CSM, il est possible d'utiliser du sérum humain mais aussi des préparations de lysats plaquettaires²⁰⁵. Une alternative serait de cultiver les cellules adhérentes en présence de facteurs de croissance et de protéines de matrice purifiées, telles que : l'« epidermal growth factor » (EGF), le « platelet-derived growth factor BB » (PDGF-BB), l'« insulin-like growth factor-1 » (IGF-1), le « basic fibroblast growth factor » (bFGF) et le « bone morphogenetic protein 4 » (BMP-4) sur un support recouvert de fibronectine, laminine et/ou collagène de type IV²⁰⁶. Ces conditions d'expansion de CSM en présence ou en absence de sérum devront être évaluées selon les paramètres décrits précédemment.

Nous avons ensuite entrepris de caractériser ces CSM amplifiées. Aucun marqueur spécifique des CSM n'a encore pu être mis en évidence. C'est pourquoi nous avons recours à une combinaison d'anticorps pour détecter ces cellules. De plus, de nombreuses variations de phénotypes ont été décrites entre espèces. Plus précisément, Peister et al. ont démontré que les MSC isolées à partir de moelle de souris adultes de souches différentes variaient, non seulement de par l'expression de leurs épitopes de surface, mais également, par leur taux de prolifération et leur capacité à se différencier²⁰⁷.

Nous obtenons une culture homogène en CSM humaines après 2 passages, et en CSM murines après 7 passages. Les CSMh présentent alors le phénotype attendu c'est-à-dire négatives pour les antigènes CD34, CD45, CD31, CD80 et HLA-DR et positives pour les antigènes HLA-1, CD73, CD90 et CD105 pour les cellules humaines. Les cellules isolées à partir de souris sont, quant à elles, négatives pour les CD45 et CD11b, exprimant faiblement le CD34 et fortement les antigènes CD106 et Sca-1. D'autre part, un critère assez simple pour

isoler des CSM repose sur leurs taille et densité cellulaire, qui dans les 2 espèces, sont supérieures à l'ensemble des autres cellules. C'est pourquoi nous avons appelé cette population CSM FSC^{high} SSC^{high}.

Pour ensuite s'assurer de la présence de cellules indifférenciées malgré l'expansion ex vivo, nous avons eu recours à des tests clonogéniques et de différenciation. Bien que le nombre de CFU-F et CFU-IC formées augmente avec la pureté des cellules, nous n'obtenons jamais que chaque cellule soit à l'origine d'une colonie. Remarquons que la technique CFUF-IC semble mettre en évidence des progéniteurs plus primitifs que ceux détectés par CFU-F car il existe un rapport constant de ± 10 entre le nombre de CFU-F formées et celui des progéniteurs comptés par CFUF-IC, et ce pour les 2 espèces. D'autre part, bien que les CSM humaines et murines purifiées se différencient systématiquement en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes, il n'est pas possible de certifier par une simple analyse visuelle que l'ensemble des cellules ont effectivement adopté les caractéristiques et le phénotypes attendus.

Nous avons également analysé le cycle cellulaire de CSM, mais aussi celui de CSH en quiescence mitotique ou après stimulation ex vivo pendant 48H, en présence d'un cocktail de facteurs de croissance stimulant les CSH à progresser dans la phase active du cycle cellulaire. Il a été démontré qu'en comparaison à des CD34⁺ non manipulées du sang périphérique, ces cellules amplifiées pendant 6 jours avec une combinaison de facteurs de croissance accélèrent l'augmentation de la production des neutrophiles et des plaquettes, sans porter atteinte à l'hématopoïèse à long terme²⁰⁸. En effet, l'expression de certaines molécules d'adhésion, présentes à la surface des CSH et pouvant influencer leur capacité de homing, varie en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. Cette position dans le cycle cellulaire modifierait donc leur potentiel de reconstitution après une greffe et serait ainsi un facteur à prendre en compte lors de la préparation de greffons²⁰⁹⁻²¹³. Nous avons constaté que les CSM à confluence ainsi que les cellules CD34⁺ fraîchement isolées sont principalement dans la phase G0/G1, mais peuvent à nouveau cycler lorsqu'elles sont exposées à des facteurs de croissance.

Particulièrement intéressés par le potentiel des CSM à intervenir dans la réparation du tissu cardiaque lésé, nous avons voulu déterminer si les CSM cultivées *in vitro* peuvent se différencier en cardiomyocytes. En effet, les conditions de culture in vitro qui induisent la différenciation des CSM médullaires en cardiomyocytes ont été décrites et consistent à compléter le milieu de culture de différenciation en 5-azacytidine. Bien que le phénotype des cellules ainsi traitées ne soit pas modifié, des modifications de morphologie sont

observées ; toutefois, nous n'observons pas l'apparition de battements spontanés des cellules, comme observé précédemment par certaines autres études²¹⁴⁻²¹⁶. Nous avons également observé d'autres changements consécutifs à l'exposition à la 5-azacytidine, tels qu'une diminution de la capacité clonogénique des cellules et une propension moindre à se différencier en ostéocytes malgré l'apparition de CBF α 1, un facteur de transcription lié à l'ostéogénèse : cela suggérerait un engagement dans une voie de différenciation. Toutefois, les CSM différenciées en cardiomyocytes possèdent également un potentiel de différenciation plus important en adipocytes, confirmé par une augmentation de la concentration en C/EBP β , facteur de transcription impliqué dans la différenciation adipocytaire. Toutefois, à l'exception de l'augmentation de la concentration de MEF2 liée au développement myogénique, aucun des autres marqueurs de la voie myogénique ou cardiomyogénique n'est exprimé. Seule l'expression de facteurs de transcription associés au cycle cellulaire (STAT3) et à l'apoptose (P53) est induite dans les cellules différenciées. L'expression de P53 dans les CSM traitées pourrait suggérer une certaine toxicité de la 5-azacytidine. L'action de cet agent déméthylant ne semble donc pas spécifique de la différenciation cardiomyocytaire. Son influence pourrait toutefois faciliter l'entrée dans cette voie de différenciation, par exemple lorsque les CSM traitées seraient injectées dans le tissu myocardique. De plus, la 5-azacytidine ne semble pas agir de façon aléatoire puisqu'un phénotype et des caractéristiques similaires sont obtenus à partir de CSM isolées de patients ou de souris différentes.

Nous avons pu démontrer l'apparition de propriétés spécifiques aux cellules cardiaques après l'induction de la différenciation. En effet, les CSM n'expriment toujours pas le CD31, mais elles expriment faiblement l' α actinine. Il existe également une réorganisation de la connexine 43 qui se localise alors de façon ponctuelle à la périphérie des cellules, rappelant davantage l'organisation observée dans les cardiomyocytes (voir chapitre II). Néanmoins, il serait important de réaliser des tests afin de s'assurer de la fonctionnalité de ces « gap junctions » formées par la connexine 43. De plus, les CSM différenciées présentent des variations plus importantes de leur concentration en calcium, propriété les rapprochant de cellules fortement excitables. Elles présentent également une plus grande force de contraction, caractéristique retrouvée dans les cellules contractiles. Ces 2 gains de fonctions pourraient montrer que les CSM traitées par de la 5-azacytidine ont entamé un processus de différenciation en cellules cardiaques. Ces cellules pourraient encore posséder une certaine plasticité ainsi qu'une capacité à changer de destin. Rangappa et al. ont précédemment démontré qu'un contact direct avec des cardiomyocytes pouvait également induire un processus de différenciation de CSM humaines en cellules cardiaques. Les CSM différenciées

après co-culture expriment alors les protéines suivantes : la chaîne lourde de la myosine, l'actine β et la troponine T²¹⁷. D'autre part, Zhang et al. ont démontré que cette capacité des CSM à se différencier en cardiomyocytes est directement liée au passage et à leur taux de prolifération²¹⁸. Il serait donc très intéressant de réaliser cette caractérisation systématique des CSM différenciés et ce, pour chaque passage.

Afin de pouvoir évaluer la contribution des greffons de cellules lorsqu'ils sont injectés dans notre modèle murin d'infarctus du myocarde, il est primordial de pouvoir détecter les cellules après leur administration. Nous avons pour cela besoin de populations homogènes possédant un marqueur « reporter ». Nous avons choisi de travailler avec des souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente GFP. Nous avons constaté que l'expression de la GFP n'est cependant pas ubiquitaire puisqu'elle ne concerne que 30% des cellules de la moelle. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la détection de la fluorescence dans les CS et avons constaté que l'expression du transgène est stable dans les CSM mais pas dans les CSH. En effet, alors que la protéine GFP est présente dans la majorité des CS, elle est absente d'une grande majorité de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle et des leucocytes différenciés du sang²¹⁹. L'expression de la GFP semble se perdre au cours des divisions et de la différenciation cellulaire. La détection de ce gène « reporter » dans les expériences de greffe risque donc d'induire une sous-estimation importante de la participation des CS aux phénomènes de réparations tissulaires. Pour pallier à ce problème, nous avons mis au point un protocole de transduction des CSM par un lentivirus exprimant l'eGFP. Alors que les taux de transfection sont proches de 100% pour les cellules humaines, les CSM d'origine murine, moins permissives, nécessitent une sélection des cellules fluorescentes préalablement à la greffe.

Après cette caractérisation complète des CSM, les perspectives de ce travail seraient de comparer la capacité de restauration tissulaire cardiaque de différents greffons, à savoir :

- (1) CSH (sélection des cellules Sca-1⁺ murines ou CD34⁺ humaines par méthode immunomagnétique) versus CSM cultivées *ex vivo*
- (2) CSM indifférenciées versus cardiomyocytes différenciés par culture *ex vivo* de CSM
- (3) CS médullaires versus CS mobilisées dans le sang périphérique par les facteurs de croissance (SCF, EPO et/ou G-CSF)
- (4) CS quiescentes versus CS en cycle mitotique.

<i>Résultats Chapitre II</i>

Développement d'un modèle murin d'infarctus du myocarde. Mise au point des techniques immunohistologiques et d'imagerie médicale permettant l'évaluation de l'impact de l'ischémie sur le muscle cardiaque murin.

2.1. Objectifs du travail et méthodes

Notre projet vise à étudier le potentiel de CS à contribuer à la réparation d'un tissu myocardique lésé par une atteinte ischémique. Pour ce faire, l'expérimentation animale in vivo semble nécessaire : c'est la raison pour laquelle la seconde partie du travail a consisté à mettre au point un modèle d'infarctus du myocarde par occlusion de l'artère coronaire gauche descendante chez la souris. Afin d'acquérir l'expérience nécessaire à la réalisation de ce protocole chirurgical, un séjour d'étude a été effectué dans le laboratoire de Pharmacologie de l'adaptation endothéliale vasculaire et de la dysfonction cardiaque du Professeur Thuillez à Rouen ; ce dernier possède une grande expérience dans différents modèles de pathologie cardiaque chez le rongeur. Notre modèle animal d'IM sera utilisé pour évaluer l'impact du G-CSF sur la fonction cardiaque et pourra également être utilisé pour réaliser des greffes de CSH et CSM murines et humaines.

De façon parallèle, nous avons développé des techniques d'histologie et d'immunohistologie qui permettront d'analyser la régénération tissulaire cardiaque après mobilisation de CS par du G-CSF. Deux anticorps dirigés contre l' α actinine et la connexine (Cx) 43 marquent les cardiomyocytes de façon spécifique. La Cx 43 permettra plus précisément de mettre en évidence les connexions entre cellules cardiaques. Un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD31 nous permet de mettre en évidence l'angiogenèse. Afin d'évaluer la taille de l'infarctus, nous avons mis au point des colorations histologiques : TTC (2,3,5-triphényl tétrazolium chloride), Masson trichrome et hématoxyline-éosine. De manière à compléter l'étude de la perfusion cardiaque, nous avons eu recours à un nouveau système d'imagerie SPECT. Nous avons validé cette méthode par la comparaison des mesures obtenues à la taille de l'infarctus du myocarde déterminée par l'analyse histologique. Nous avons aussi besoin d'obtenir des informations sur l'hémodynamique cardiaque fine. Pour ce faire, des échographies ont été réalisées avant l'opération, le jour de l'induction de l'infarctus et 7 jours plus tard. Nous réalisons également des mesures par cathéter à conductance au 7ème jour après la ligature coronaire. L'échographie et la technique de sonde à conductance

sont deux techniques complémentaires qui nous permettront d'étudier le processus de remodelage ventriculaire et la fonction myocardique.

2.2. Résultats

2.2.1. Modèle murin d'infarctus du myocarde

2.2.1.1. Protocole expérimental

Les souris anesthésiées par un mélange de kétamine-xylazine sont intubées et placées sous respirateur. Leurs cages thoraciques peuvent ensuite être ouvertes afin d'atteindre le cœur. L'artère coronaire gauche descendante est alors visualisée sous microscope et ligaturée. La zone qui n'est plus vascularisée devient aussitôt visible par un blanchiment du muscle cardiaque dans la zone infarctée. Il est important d'obtenir des tailles d'infarctus reproductibles entre les différents animaux, dans le but d'obtenir des groupes homogènes qui pourront être comparés entre eux (Fig.29). Pour ce faire, le point de ligature devra être réalisé de façon systématique à la même hauteur. Les souris sont ensuite maintenues sous assistance respiratoire et sous contrôle de température jusqu'au premier signe de réveil. L'entièreté de la procédure dure 1h30. Les animaux opérés sont observés visuellement, et ce de façon quotidienne, afin de détecter d'éventuels signes de douleurs qui sont contrôlés par l'administration d'un analgésique. De façon surprenante, ceux-ci présentent un comportement normal, sans signes de douleurs, de troubles alimentaires ou encore, de difficultés à la locomotion.

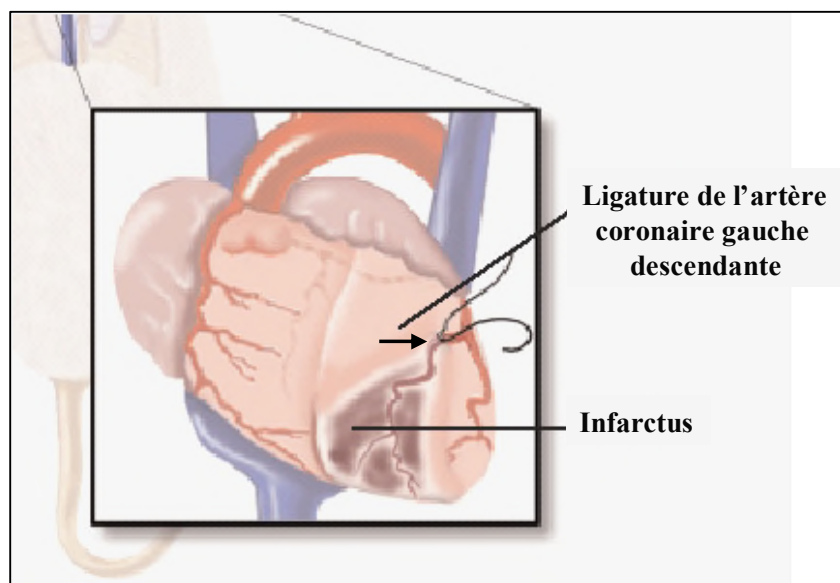


Figure 29 : Induction expérimentale d'un infarctus du myocarde chez la souris

2.2.1.2. Anatomopathologie

Après l'induction de l'IM, nous observons un amincissement très important de la paroi du ventricule ischémié (Fig. 30D), la dilatation de cette cavité (Fig. 30B), ainsi qu'une augmentation du poids du coeur de 89 ± 21 mg (Fig. 31). Ce fait est dû à une hypertrophie du ventricule droit sain et du muscle du VG préservé qui s'adapte à la perte de cardiomyocytes. Ces trois modifications de l'anatomie cardiaque sont reprises sous le terme de remodelage ventriculaire. Les analyses histologiques et la coloration à l'hématoxyline-éosine montrent que la zone d'infarctus comprend une portion importante des parois antérieure et latérale, l'entièreté de la zone apicale et est parfois étendue aux territoires moyen et apical de la paroi inférieure. Le septum est généralement épargné. On peut observer une nécrose de coagulation, des fibres musculaires cardiaques irrégulières, un aspect hyper-éosinophile et l'infiltration de cellules inflammatoires dans les espaces entre les fibres mortes. Ces cellules inflammatoires présentent une morphologie similaire à celle des polynucléaires neutrophiles.



Figure 30 : A. Coeur sain de souris C57Bl6. B. Coeur après ligature de l'artère coronaire. Epaisseur de la paroi du VG C. chez des animaux sains D. chez des animaux souffrant d'IM (zone de l'IM°

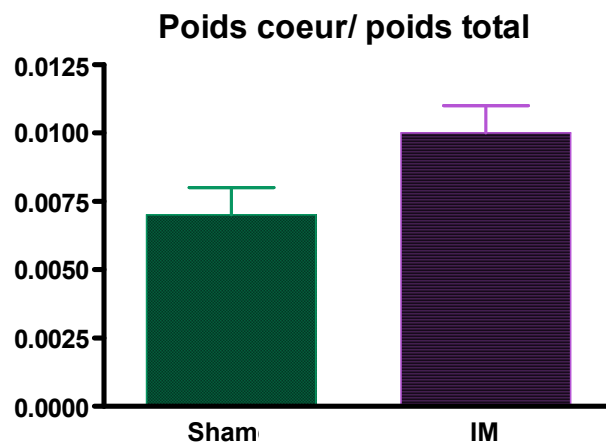


Figure 31: Evolution du poids du coeur des souris après induction d'un IM. Sham = «sham-operated animals» (animaux ayant subi l'entièreté de l'opération, à l'exception de la ligature).

2.2.1.3. Survie

Nous avons réalisé des courbes de survie chez des souris «sham-operated» (animaux ayant subi l'entièreté de l'opération, à l'exception de la ligature) et chez des souris ligaturées afin de déterminer l'impact de cette chirurgie. L'opération sans l'induction de l'infarctus n'induit pas une mortalité précoce. Par contre, après ligature, la mortalité augmente à 30%. Les décès des animaux avec un IM surviennent dans les 5 premiers jours suivant l'intervention. Dès lors, nous pourrions ainsi déterminer si un traitement par du G-CSF permet d'augmenter cette survie (Fig.32).

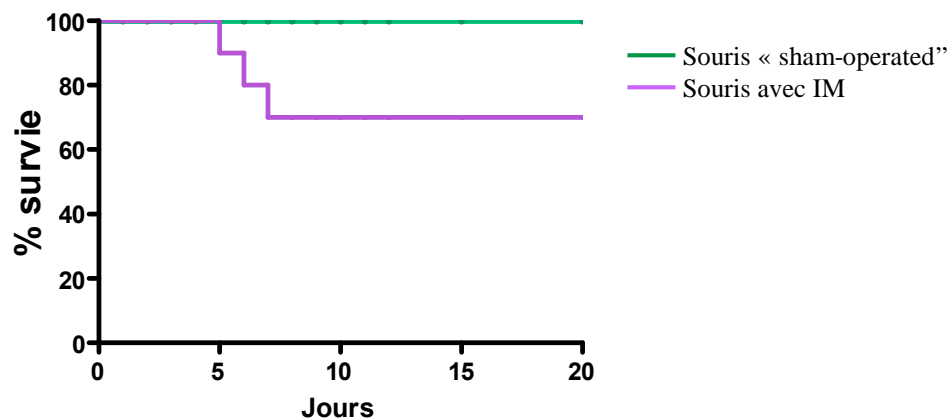


Figure 32: Survie des souris «sham operated» et des souris ayant subi une ligature de l'artère coronaire

2.2.2. Analyse immunohistologique de sections de cœurs murins

Afin de déterminer l'impact de la mobilisation de cellules souches sur la fonction myocardique, il a été nécessaire de mettre au point des techniques d'histologie et d'immunohistologie qui permettront d'analyser la régénération tissulaire cardiaque après greffes de cellules souches. Sur des coupes de cœurs sains, l'anticorps dirigé contre l'antigène CD31 nous permet de mettre en évidence l'angiogenèse, de dénombrer et de suivre le trajet des capillaires cardiaques (Fig. 33A); l'Ac anti l' α -actinine identifie une protéine secondaire du cytosquelette des cardiomyocytes intervenant dans la contraction musculaire. Nous pouvons observer l'organisation de la protéine distribuée dans l'ensemble des cellules et la striation des cardiomyocytes sur les coupes de cœurs marquées à l'aide de cet anticorps (Fig.33B). La connexine 43 permet la communication entre cellules cardiaques et forme des «gap junctions» au travers desquels des messages chimiques sont transmis. Cette protéine est localisée de façon ponctuelle à la périphérie des cardiomyocytes (Fig. 33C). Lorsque nous réalisons ces immunohistologies sur des coupes de cœurs infarcis, nous observons une perte

totale du marquage et de l'organisation cellulaire et tissulaire. Dès lors, nous pourrions déterminer si un traitement par du G-CSF a un impact sur la restauration tissulaire cardiaque.

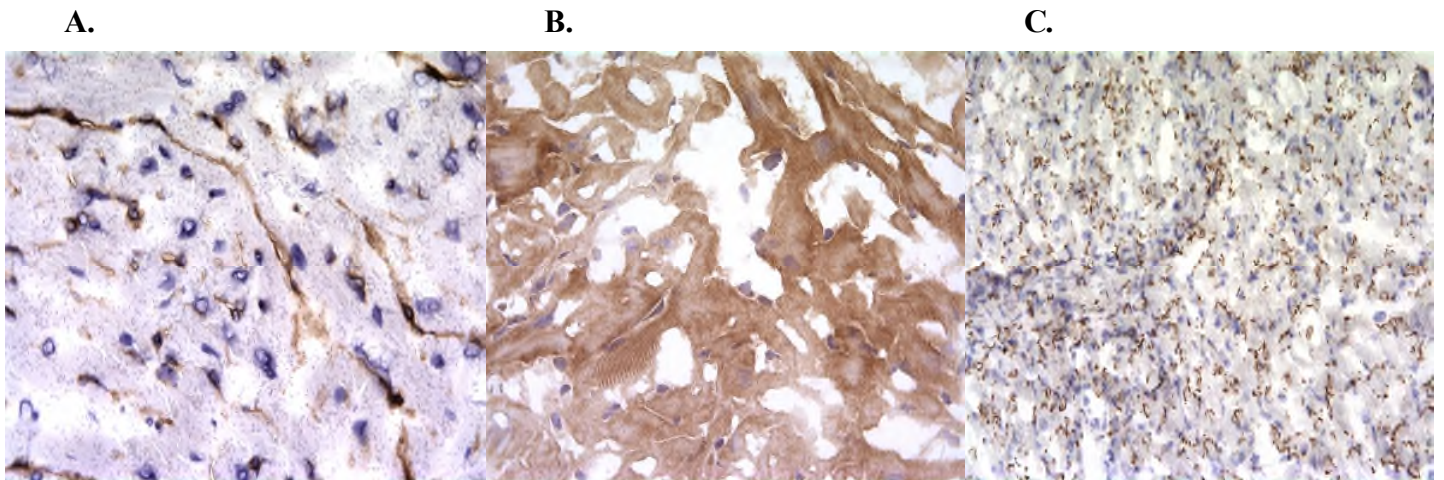


Figure 33 : Marquages immunohistochimiques sur des cœurs de souris C57Bl/6 saines (Grossissement 50X) **A.** Anticorps anti-CD31 dilué à 1/500 **B.** Anticorps anti- α actinine dilué à 1/1600 **C.** Anticorps anti-connexine 43 dilué à 1/2000.

2.2.3. Détermination de la taille de l'infarctus

Afin d'évaluer la taille de l'infarctus, nous avons mis au point 2 colorations histologiques, en plus de la coloration classique à l'hématoxyline éosine : (1) le TTC (2,3,5-triphényl tétrazolium chloride), coloration macroscopique qui met en évidence les zones potentiellement fibrosées après une ischémie prolongée. Nous obtenons ainsi une coloration mauve des zones saines et une absence de coloration dans la zone infarctée contenant des cellules mortes ou en souffrance : nous pouvons donc délimiter le tissu cardiaque qui n'est plus vascularisé (Fig. 34A.) ; (2) Masson trichrome, coloration microscopique qui met en évidence le tissu conjonctif (collagène) et permet de délimiter les zones de fibrose (cicatricielles) (Fig. 34B).

La taille de la zone fibrosée obtenue par l'analyse des marquages TTC est de 52.3 ± 12.1 %. L'évaluation des dépôts de collagène par coloration au trichrome fournit des résultats similaires, bien que la taille de l'infarctus soit systématiquement inférieure d'approximativement 5%. Une infiltration du muscle ischémié par des globules blancs est observée sur les coupes colorées à l'hématoxyline éosine (Fig. 34C).

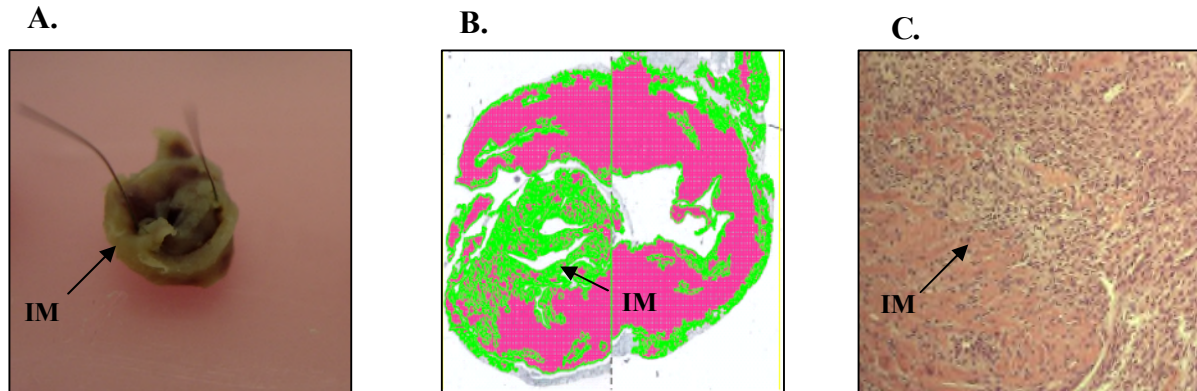


Figure 34 : Détermination de la taille de l'infarctus **A.** après coloration au TTC, **B.** par analyse planimétrique de la coloration au trichrome et **C.** par coloration à l'hématoxyline éosine. Présence d'un infiltrat de globules blancs visible.

2.2.4. Mise au point des techniques d'imagerie médicale

Nous avons besoin d'obtenir des informations sur l'hémodynamique cardiaque fine et sur l'évolution de la vascularisation dans notre modèle de ligature de l'artère coronaire gauche chez la souris. Pour ce faire, nous avons mis au point des techniques échocardiographiques, par sonde à conductance et par μ SPECT.

2.2.4.1. Validation de l'analyse par μ SPECT

Nous avons réalisé une évaluation de la taille de l'infarctus par un nouveau système de μ Spect (Linoview Spect) chez la souris, en collaboration avec le Docteur Roelants à l'Université Catholique de Louvain. Après injection à la souris de Tc-99m-sestamibi, nous pouvons estimer la perfusion myocardique, grâce à une excellente résolution spatiale de 0.35 mm et à un temps de rétention spécifique à chaque organe. En effet, ce traceur est distribué dans l'organisme de façon proportionnelle à la perfusion. Nous obtenons des images de qualité équivalente à celles obtenues dans les études cliniques humaines (Fig. 35). L'analyse des images repose sur une échelle de couleurs, les zones dans les couleurs froides (noir < bleu...) sont les zones de moindre rétention du radio-traceur et donc de plus faible perfusion et les zones de couleurs chaudes (vert < jaune < rouge) sont les régions ayant fortement fixé le sestamibi et qui présentent une bonne vascularisation.

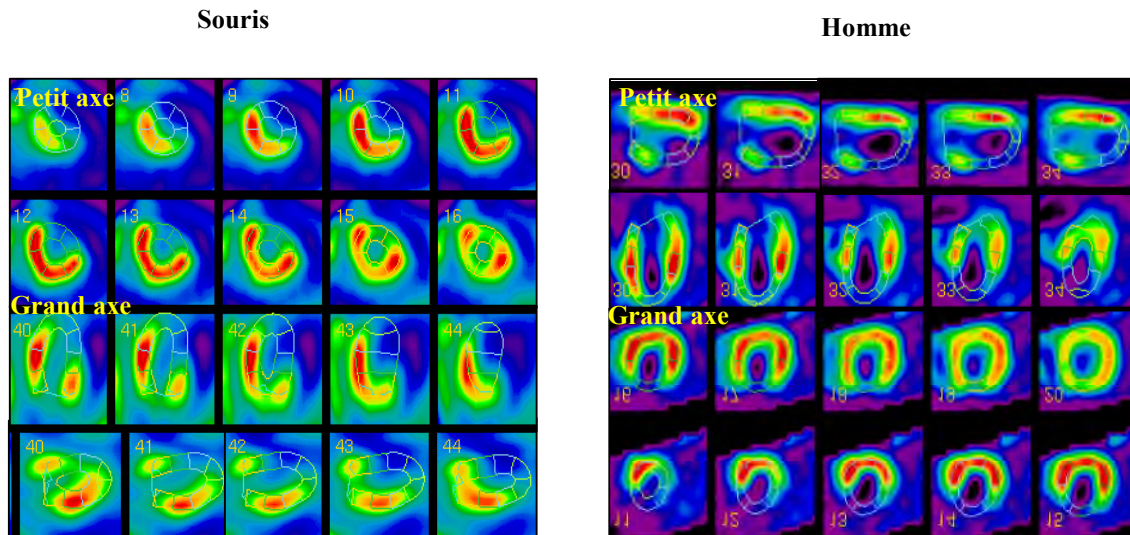


Figure 35: Exemple de la perfusion myocardique par analyse SPECT chez la souris et l’homme après infarctus. Les zones dans les couleurs froides (noir < bleu...) sont les zones de moindre perfusion et les zones de couleurs chaudes (vert < jaune < rouge) sont les régions qui présentent une bonne vascularisation.

Nous pouvons alors comparer ces images avec l’histologie pour la détermination de la taille de l’infarctus (Fig. 36). Nous obtenons une excellente corrélation entre les valeurs obtenues avec le Linoview Spect et par coloration histologique TTC (R=0.95, p<0.001) (Fig. 37A.) ou trichrome (R=0.91, p<0.001) (Fig. 37B.).

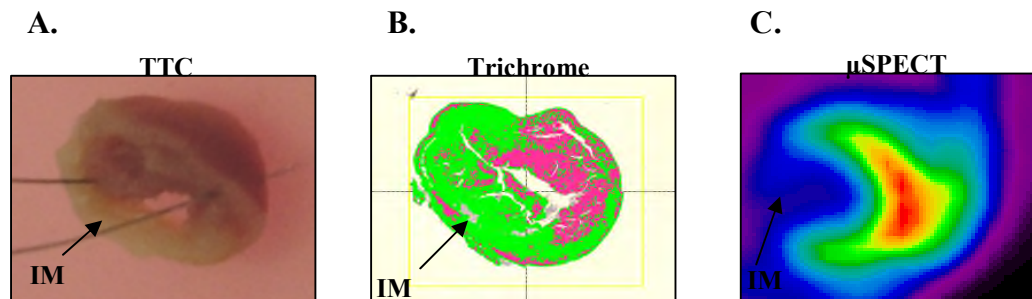


Figure 36: Analyse par coloration A. TTC, B. trichrome et C. μSPECT en petit axe d’un même animal.

Nous avons vérifié ces valeurs en répétant l’analyse des images 3 fois et avons obtenu une variation intra-observateur inférieure à 1%. Nous avons également fait analyser les mêmes images par un second observateur et avons obtenu une variation inter-observateur également inférieure à 1%. Dans les deux cas, le test statistique Bland-Altman montre que les variations n’excèdent jamais 2 déviations standard (Fig.38). Nous pouvons donc en conclure que les analyses μSPECT sont reproductibles quel que soit l’observateur. Nous pouvons également analyser en parallèle la perfusion myocardique par μSPECT et l’évolution de l’angiogenèse par le marquage immunohistologique CD31. La technique du μSpect est donc réalisable chez la souris et permet une détermination précise de la taille de l’infarctus.

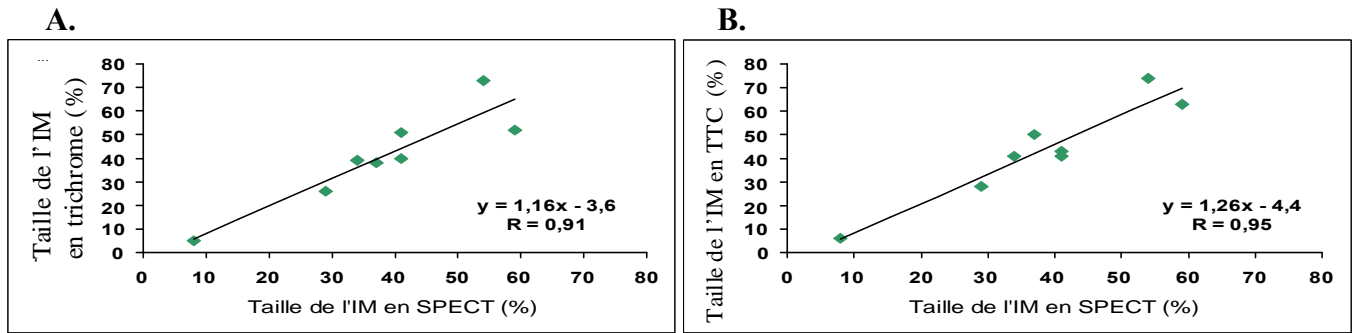


Figure 37 : Corrélation entre le SPECT et l'histologie pour la détermination de la taille de l'IM **A.** SPECT versus trichrome **B.** SPECT versus TTC.

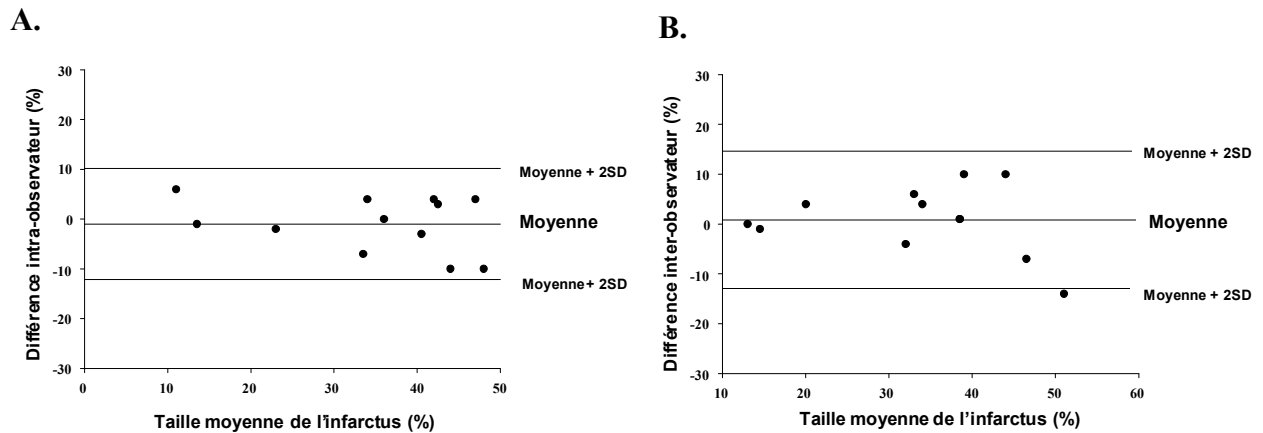


Figure 38 : Résultats du test statistique Bland-Altman pour la reproductibilité de la détermination de la taille de l'infarctus par μ Spect **A.** variabilité intra-observateur et **B.** variabilité inter-observateur.

2.2.4.2. Analyses hémodynamiques par échocardiographie

Des analyses échocardiographiques sont réalisées avant l'opération, le jour de l'induction de l'infarctus et 7 jours plus tard (Tableau 6). La fréquence cardiaque (FC) est similaire chez les souris «sham operated» et chez les animaux ligaturés. Aux jours 1 et 7, les dimensions internes du VG en fin de diastole (DIVGd) et de systole (DIVGs) sont supérieures chez les animaux présentant un IM. L'épaisseur de la paroi postérieure du VG (EPVG) et du septum interventriculaire en systole (ESIs), de même que les valeurs de la fraction d'éjection du VG (FEVG) et du débit cardiaque (DC), sont inférieures chez les souris présentant un IM. Les mesures de déformation du muscle cardiaque par analyse du strain dans la zone de l'IM (strain IM) sont sévèrement diminuées après l'induction de l'infarctus. Par contre, une augmentation de la déformation de la paroi postérieure se manifeste par une augmentation du strain dans cette région du cœur (strain pp). Le strain global n'est significativement diminué que le lendemain de l'IM ; mais est toujours inférieur chez les animaux ligaturés par rapport aux souris «sham-operated». Au J7, ce paramètre n'est pas significativement différent entre les 2 groupes. La reproductibilité inter-observateur pour les paramètres strain est excellente. Une forte corrélation entre les deux observateurs est observée (strain dans la zone de

l'infarctus du myocarde: $r=0.85$; $p<0.001$; strain dans la paroi postérieure du ventricule gauche: $r=0.87$, $p<0.001$). L'analyse de Bland-Altman a indiqué que la différence obtenue était inférieure à 2 SDs de la différence moyenne pour toutes les valeurs de contrainte.

Tableau 6 : Paramètres échocardiographiques évalués au J1 et au J7 après l'opération chez les souris « sham operated » et chez les souris ligaturées. N=24

	J1		J7	
	Sham-operated	IM	Sham-operated	IM
FC (bpm)	254 ± 73	262 ± 45	266 ± 82	262 ± 64
DIVGd (mm)	3.8 ± 0.5	4.5 ± 0.2 ^{***}	3.8 ± 0.5	4.1 ± 0.3
DIVGs (mm)	2.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3 ^{***}	3.1 ± 0.3	3.8 ± 0.2 ^{***}
EPVG (mm)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1 ^{***}	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2
ESIs (mm)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2 [*]	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2 [*]
LVEF (%)	65.2 ± 2.6	44.9 ± 6.0 ^{***}	61.9±4.1	45.8 ± 12,6 ^{***}
DC (µl/sec)	213 ± 99	143 ± 128	200±77	162 ± 63
Strain IM (%)	33,0± 5.8	7.8 ± 3.9 ^{***}	37.0±6.1	6.4 ± 4.0 ^{***}
Strain pp (%)	29.0 ± 10.3	37.1 ± 16.8	30.0±8.3	36.1 ± 5.1
Strain global (%)	9.2 ± 3.9	6.3 ± 2.0 [*]	9.2 ± 3.9	7.8 ± 2.3

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; DIVGd = dimensions internes du VG en fin de diastole ; DIVGs = dimensions internes du VG en fin de systole; EPVG = épaisseur de la paroi postérieure du VG ; ESIs = épaisseur du septum interventriculaire en systole; FEVG = fraction d'éjection du ventricule gauche; DC = débit cardiaque; strain IM = strain dans la zone de l'infarctus du myocarde ; strain pp = strain dans la paroi postérieure du ventricule gauche.

Les valeurs de p sont données en comparaison avec les données des souris « sham-operated » au J1 et au J7 : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

2.2.4.3. Evaluation des relations pression-volume par sonde à conductance

Nous réalisons également des mesures par cathéter à conductance au 8^{ème} jour après la ligature coronaire, soit en condition basale, soit après réduction de la précharge (Tableau 7). Chez les animaux «sham operated», la fréquence cardiaque (FC) est similaire à celle des animaux ligaturés. Après l'induction de IM, la pression de fin de systole (PFS) est augmentée alors que la valeur correspondante en diastole (PFD) et le volume de fin de diastole (VFD) sont inchangés. Nous observons une diminution du travail (TM) et du volume myocardique (VM) chez les animaux ligaturés par rapport au groupe «sham-operated». Cependant, les valeurs de la constante de relaxation Tau-w et de l'élastance (Ees) restent inchangées.

Tableau 7: Evaluation de la fonction du ventricule gauche 8 jours après l'opération chez les souris « sham operated » et chez les souris ligaturées par des mesures de pression-volume, dans les conditions basales ou après réduction de la précharge. N=24

	Sham-operated	IM
FC (bpm)	256 ± 82	263 ± 64
PFS (mm Hg)	88.2 ± 17.3	66.9 ± 10.4 **
PFD (mm Hg)	9.6 ± 5.8	10.4 ± 5.9
VFS (µL)	58.9 ± 21.4	92,0 ± 25.6
TM (µL)	30.1 ± 10.6	20.9 ± 8.3
VM (mmHg*µl)	1929 ± 245	1015 ± 463 **
Tau-w (msec)	13.0 ± 2.5	14.1 ± 5.3
Ees (mmHg/ml)	2.65 ± 0.94	2.13 ± 1.27

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; PFS = pression de fin de systole, PFD = pression de fin de diastole, VFS = volume de fin de systole, TM travail myocardique, VM = volume myocardique ; Tau-w = constance de relaxation mesurée par la méthode « Tau-Logistic » ; Ees = élastance.

Les valeurs de p sont données en comparaison avec les données des souris « sham-operated »: *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001.

2.3. Discussion

Notre projet se propose d'étudier le potentiel de CS mobilisées par du G-CSF à participer aux phénomènes de restauration d'un tissu myocardique lésé par une atteinte ischémique (voir chapitre IV). C'est pourquoi nous avons mis au point un modèle d'infarctus du myocarde (IM) par occlusion de l'artère coronaire chez la souris, ainsi que les techniques d'histologie et d'immunohistologie qui permettront d'analyser la régénération tissulaire cardiaque. Nous pourrions également évaluer l'impact de de la thérapie par G-CSF sur la fonction myocardique fine et de la perfusion du myocarde.

Concrètement, nous pourrions évaluer une éventuelle amélioration du point de vue anatomopathologique : diminution de l'infiltration cellulaire du tissu cardiaque, diminution de la taille de l'infarctus et des phénomènes de remodelage ventriculaire se traduisant par une diminution de la dilatation du VG, un moindre amincissement de la paroi et une augmentation plus limitée du poids du cœur. Il semblerait en effet que ce dernier paramètre puisse constituer à lui seul un critère déterminant pour évaluer la présence d'un infarctus du myocarde chez les souris²²⁰⁻²²².

Nous pourrions également suivre la survie des animaux après traitement. Malgré des tailles d'infarctus très importantes, nous observons finalement assez peu de décès (30% de mortalité). Toutefois, une étude réalisée par Pons et al. démontre que, malgré un haut taux de survie (comparable à celui que nous observons), le model murin d'infarctus du myocarde après ligature présente toutes les caractéristiques d'une défaillance cardiaque

cardiomyopathique telles qu'une dilatation post-ischémique et de la congestion²²³. Cette étude se base sur l'analyse de souris C57Bl6 ayant subi un protocole chirurgical similaire au nôtre et un suivi histologique et hémodynamique par échocardiographie et sonde à conductance sur une durée de 12 mois. Nous pouvons donc en conclure que notre modèle est un bon modèle pour les pathologies ischémiques humaines et qu'il offre le background nécessaire à l'évaluation de la thérapie cellulaire, mais également des manipulations génétiques ou des effets de drogues.

Les marquages immunohistologiques nous permettront également d'apprécier une éventuelle amélioration de l'organisation des fibres cardiaques. Le marquage à l'aide de l'anticorps anti-CD31 sera très utile pour détecter des variations de densité de capillaire associées à des phénomènes d'angiogenèse, mais également pour établir un parallèle avec des modifications de la perfusion du cœur observées par μ SPECT.

D'autre part, les marquages à l'aide de l'anticorps anti-connexine 43 sur les coupes de cœurs sains montrent une organisation de cette protéine en cluster et en périphérie des cellules, se rapprochant de ce que nous avons pu observer sur les préparations de CSM différenciées en cardiomyocytes par de la 5-azacytidine. Les CSM indifférenciées, quant à elles, ne présentent pas cette organisation de la protéine : ceci peut faire penser que ces cellules expriment effectivement la connexine 43 mais que cette dernière n'y exerce pas son rôle de jonction intercellulaire. Kanno et al. ont démontré que des souris déficientes en connexine 43 développaient des infarctus de taille moindre après ligature de l'artère coronaire. L'expression de la connexine 43 pourrait donc déterminer la taille de l'IM chez la souris. Les nouvelles thérapies qui tentent de diminuer le risque d'arythmie en augmentant la communication intercellulaire pourraient donc aboutir à un effet secondaire important en induisant des tailles d'infarctus plus grandes en cas d'ischémie²²⁴.

Nous avons ensuite démontré que la technique du μ Spect est réalisable chez la souris et permet une détermination précise de la taille de l'infarctus. En effet, vu les très petites dimensions du cœur de souris, nous avons besoin d'une résolution spatiale élevée que nous offre le nouveau système de μ Spect (Linoview Spect) : celui-ci peut en effet différencier deux points éloignés de 0.35mm^{200} . Nous obtenons, des images de qualité équivalente à celles obtenues dans les études cliniques humaines. Nous avons validé cette technique en montrant une excellente corrélation entre la taille de la zone ischémisée mesurée par μ Spect et celle obtenue par les techniques histologiques de coloration au TTC ou trichrome. Nous avons également observé un faible taux de variation inter-observation ou inter-observateur des valeurs. Et enfin, il sera intéressant d'évaluer si les modifications de perfusion du muscle cardiaque sont corrélées à une expression différente de l'antigène CD31.

Afin de monitorer l'évolution des paramètres hémodynamiques cardiaques fins dans notre modèle murin, nous avons eu recours aux techniques d'échocardiographie et de sonde à conductance. Ces deux techniques nous donnent accès à différents paramètres qui sont modifiés chez les souris présentant un IM et que nous pourrions analyser et comparer entre les différents groupes d'animaux traités ou contrôles: fréquence cardiaque, fraction d'éjection, volume et pression systolique et diastolique du ventricule gauche²²⁵. En accord avec les données histologiques, l'échocardiographie et les mesures pression-volume ont démontré une augmentation des dimensions du VG et une diminution de l'épaisseur du mur postérieur. L'échocardiographie en mode strain permet l'évaluation de la fonction systolique et diastolique par la mesure quantitative de la déformation régionale. Le strain dans le secteur infarcté et le strain global ont été sensiblement diminués après le MI, alors que le strain du mur postérieur était augmenté, indiquant la déformation réduite dans le secteur pathologique du myocarde et une hyperkinésie compensatoire dans les autres segments. Les données échocardiographiques et hémodynamiques révèlent également une diminution de la FEVG ainsi que du débit cardiaque, du travail et du volume myocardique, mais ne montrent aucun impact sur Ees. Ce paramètre représente la contractilité du ventricule gauche et est donc en relation directe avec la fonction systolique globale. La constante de temps de relaxation Tau-W reflète le processus de relaxation actif et précoce. Cette constante est augmentée après l'induction de l'IM, indiquant une relaxation anormale du cœur, en accord avec des valeurs accrues du VFS, suggérant une compliance inférieure chez les souris ligaturées. La PFD reste toutefois inchangée.

Plusieurs études ont démontré que l'échographie^{193,226} et la technique de sonde à conductance^{223,227} sont deux techniques complémentaires, qui permettent d'étudier le processus de remodelage ventriculaire dans notre modèle murin d'infarctus du myocarde. Toutefois, et particulièrement pour l'échocardiographie, la qualité de la sonde est critique et il n'est pas aisé d'être parfaitement reproductible sur les valeurs des diamètres mesurés. Ceci est à nouveau lié à la très petite taille du cœur de souris mais également à sa très haute fréquence cardiaque. Néanmoins, il a été démontré que l'évaluation par la méthode « strain rate » est fiable chez la souris et peut être utilisée pour étudier la fonction cardiaque¹⁹⁸.

En résumé, nous avons mis au point une série de techniques fines d'évaluation de la fonction myocardique chez la souris normale ou infarctée. Aucune recherche publiée précédemment n'a associé les techniques d'échocardiographie, de sonde à conductance et de μ SPECT pour l'étude de la physiopathologie cardiaque chez la souris.

Nous devons toutefois relever une difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés durant les analyses hémodynamiques des cœurs de nos souris. Nous obtenons une fréquence

cardiaque basse pendant l'évaluation de fonction myocardique malgré l'utilisation de la kétamine à 100 mg/kg et de la xylozine à 0.1mg/kg. Ce protocole est décrit dans la littérature comme le dosage optimal afin d'obtenir une fréquence cardiaque élevée et stable, une fraction de raccourcissement élevé et induisant le moins d'effet sur les dimensions internes du VG en fin de diastole¹⁹⁵. En outre, nous avons examiné d'autres protocoles d'anesthésie tels que l'emploi du pentobarbital (30 mg/kg) ou de l'isoflurane avec le même impact sur la fréquence cardiaque. Nous avons cependant obtenu la même fréquence cardiaque dans les quatre groupes de souris, ce qui nous a ainsi permis de les comparer entre eux.

Nos expériences révèlent également certains résultats apparemment contradictoires. En effet, le diamètre du ventricule mesuré par échocardiographie et le volume du VG évalué par sonde à conductance évoluent en parallèle, mais nous obtenons des différences pour les valeurs absolues. Ces discordances peuvent être expliquées par la difficulté d'analyser des images sur un cœur si petit et battant à une fréquence très élevée, nécessitant une très grande résolution pour obtenir des mesures précises.

<i>Résultats Chapitre III</i>

Mobilisation des précurseurs hématopoïétiques, mésenchymateux et endothéliaux par du G-CSF et conséquences sur la perfusion et les performances du muscle cardiaque sain.

3.1. Objectifs du travail et méthodes

Il est maintenant clairement établi que les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques et non-hématopoïétiques résident principalement dans la MO, mais qu'un nombre restreint de ces cellules circule dans le SP dans des conditions physiologiques. Ce nombre de cellules qui circulent en périphérie peut être augmenté après une induction pharmacologique. Le G-CSF est généralement l'agent le plus utilisé dans la pratique clinique pour induire la mobilisation des CS. Obtenues au terme d'une procédure moins invasive, ces dernières permettent une prise de greffe et une récupération durable des fonctions de la MO plus rapides. La MO offre un micro-environnement approprié pour les CS et constitue un réservoir pour les CSH, CSM et PE. Si la mobilisation de CSH est aujourd'hui bien documentée, l'impact d'un traitement par G-CSF sur les CSM et les PE reste incertain. La collecte d'un nombre suffisant de CS est la première étape pour permettre de régénérer la MO et l'hématopoïèse à long terme, après greffe. C'est pourquoi, la mobilisation et la collecte des SC du SP doivent être optimisées. Malgré des connaissances en constante évolution, le mécanisme et la cinétique précis de la mobilisation dans le SP des cellules progénitrices par le G-CSF restent hypothétiques. La posologie exacte de G-CSF, la durée d'administration et le moment auquel le traitement devrait être initié n'ont pas encore été déterminés. Afin de mieux cerner par quels mécanismes le G-CSF pourrait participer aux phénomènes de réparation du tissu cardiaque lésé par une altération de la perfusion, il est important d'évaluer sa capacité à mobiliser les cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH), mésenchymateuses (CPM) et endothéliales (CPE). De même, la cinétique selon laquelle les progéniteurs sont mobilisés, la cellularité de la MO ainsi que la capacité clonogénique des CS de la MO et du SP constituent des indications importantes pour déterminer la durée optimale des traitements. Le but de notre étude était donc d'explorer quelles cellules progénitrices sont mobilisées par le G-CSF et selon quelle cinétique. Nous avons également évalué la capacité clonogénique des CSH et des CSM de la MO ou du SP tout au long du traitement par le G-CSF.

Pour ce faire, des souris ont été injectées quotidiennement pendant 1 à 10 jours par du G-CSF, et 12 animaux ont été sacrifiés chaque jour pour prélever leur cœur, leur sang et leur MO. Des souris constituant le groupe contrôle ont été injectées quotidiennement pendant 10 jours successifs avec un tampon salin.

Nous avons également mis au point, chez trois patients sains mobilisés par du G-CSF ou de l'EPO, l'analyse FACS ainsi que les essais fonctionnels de formation de colonies permettant d'évaluer la cinétique de mobilisation de progéniteurs dans le SP chez l'homme. La cellularité de la MO a été étudiée avant et pendant la mobilisation par les facteurs de croissance.

D'autre part, l'effet de l'administration de G-CSF sur la perfusion myocardique et les performances hémodynamiques d'un cœur normal n'a jamais été étudié. Nous avons donc examiné quantitativement l'effet à court terme de l'administration de G-CSF sur la perfusion myocardique par μ SPECT, et sur la fonction myocardique, par échocardiographie et cathétérisme cardiaque chez des souris normales.

L'objectif final de cette troisième partie est de déterminer le timing le plus approprié pour l'administration du G-CSF, non seulement pour améliorer la collecte par aphérèse des 3 types de CS dans le but d'une reconstitution optimale de la MO chez les patients transplantés, mais aussi pour établir le meilleur protocole pour l'usage du G-CSF en thérapie cellulaire. Enfin, il est important de déterminer si l'injection de G-CSF est sûre en clinique.

3.2. Résultats

3.2.1. G-CSF et cellules progénitrices

3.2.1.1. Paramètres médullaires et sanguins

Nous avons pu constater une augmentation de l'hématocrite à partir du premier jour de l'administration du G-CSF ; tout au long de l'étude, ce paramètre est resté plus élevé chez les souris mobilisées que chez les souris non traitées. Le nombre de globules blancs de la moelle diminue du jour 1 au jour 4 du traitement avant de se stabiliser par la suite à une valeur intermédiaire, toujours moins élevée que chez les souris non mobilisées. Le nombre de globules blancs du SP, quant à lui, augmente les quatre premiers jours avant de retourner ultérieurement à la valeur basale. L'évolution des globules blancs du sang est l'image en miroir de celle des cellules mononucléées de la MO (Fig. 39).

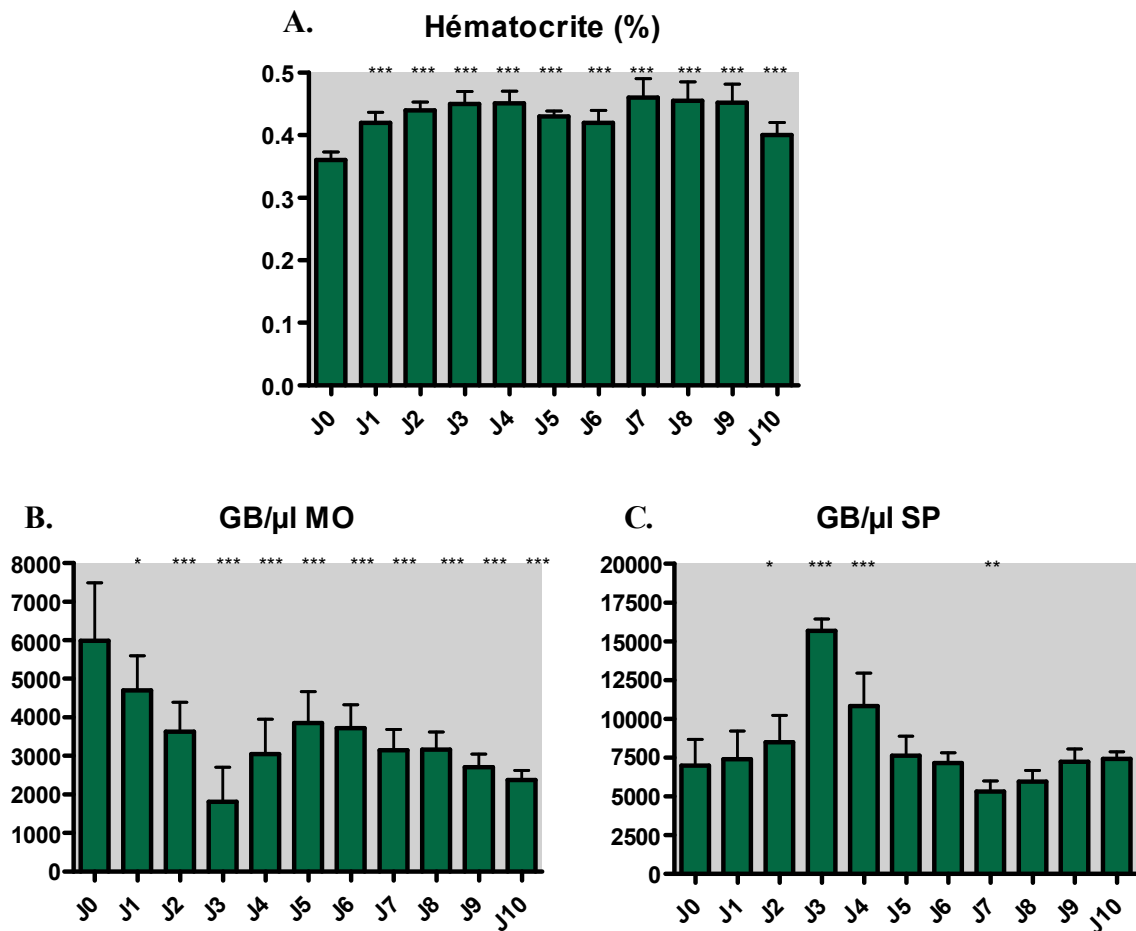


Figure 39: A. Evolution de l'hématocrite. Evolution du nombre de globules blancs B. dans la MO et C. dans le SP chez des souris injectées pendant 1 à 10 jours avec du G-CSF. Les statistiques sont données par comparaison aux valeurs des souris non traitées (J0) : * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001.

3.2.1.2. Analyse au Facs des précurseurs mobilisés (Fig.40)

Chez les animaux traités par le G-CSF, nous avons observé, par analyse en cytométrie de flux, que le nombre de CPH de la MO augmente fortement et est maximal au J2 et J7. Ce phénomène est systématiquement suivi d'une augmentation importante des CPH dans le SP. Le nombre de CPM dans la MO montre un pic au 2^{ème} jour après l'initiation du traitement, avant de progressivement rediminuer, tandis que ces cellules sont alors plus élevées dans le SP. Le nombre de PE augmente progressivement jusqu'au J7 avant de retourner au taux basal ultérieurement. Dans le SP, le nombre de ces progéniteurs est maximum au J3, avant d'atteindre des niveaux intermédiaires à partir du jour 5 jusqu'au jour 10. Un exemple d'analyse classique en cytométrie de flux est présenté à la figure 41.

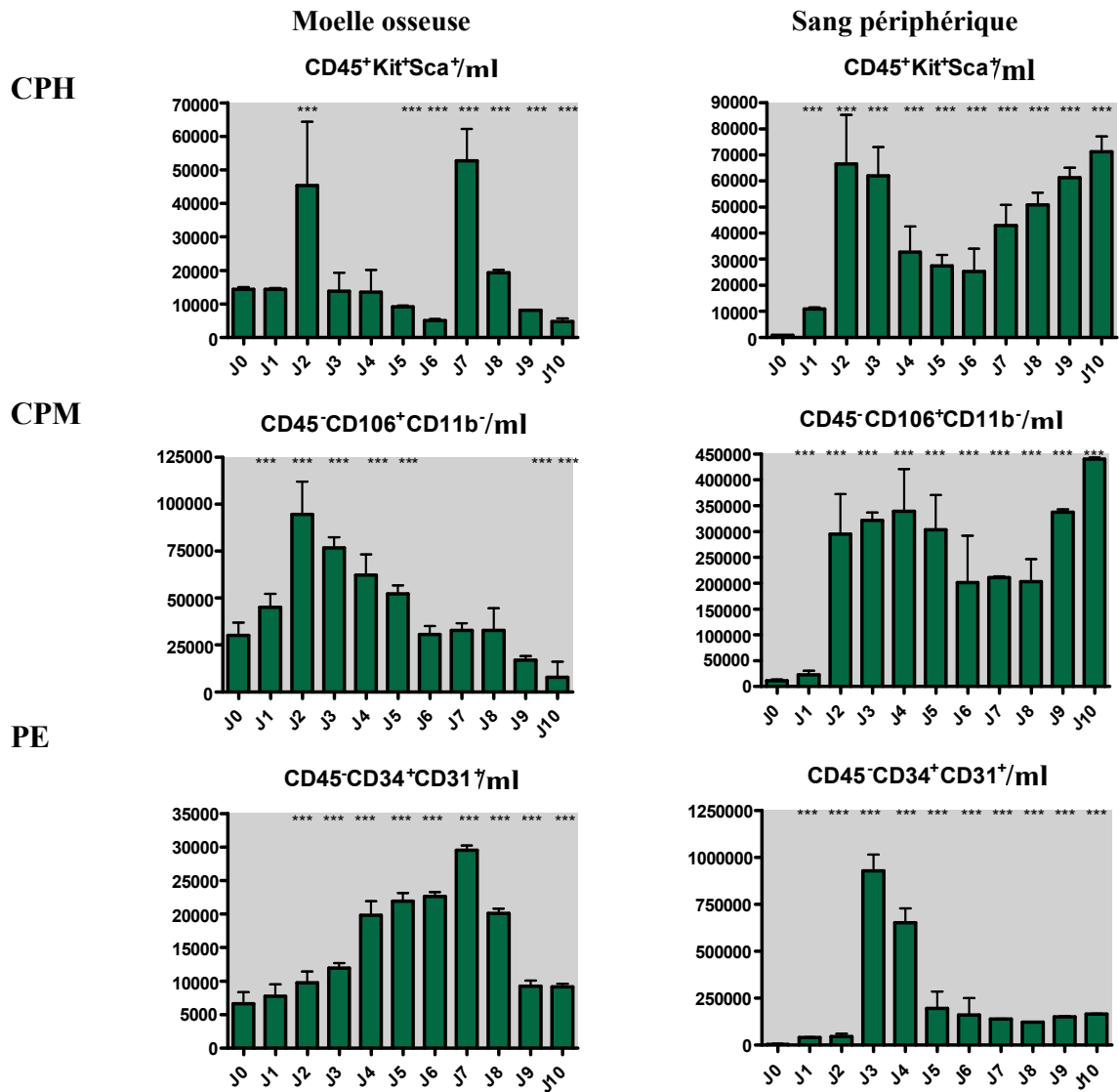
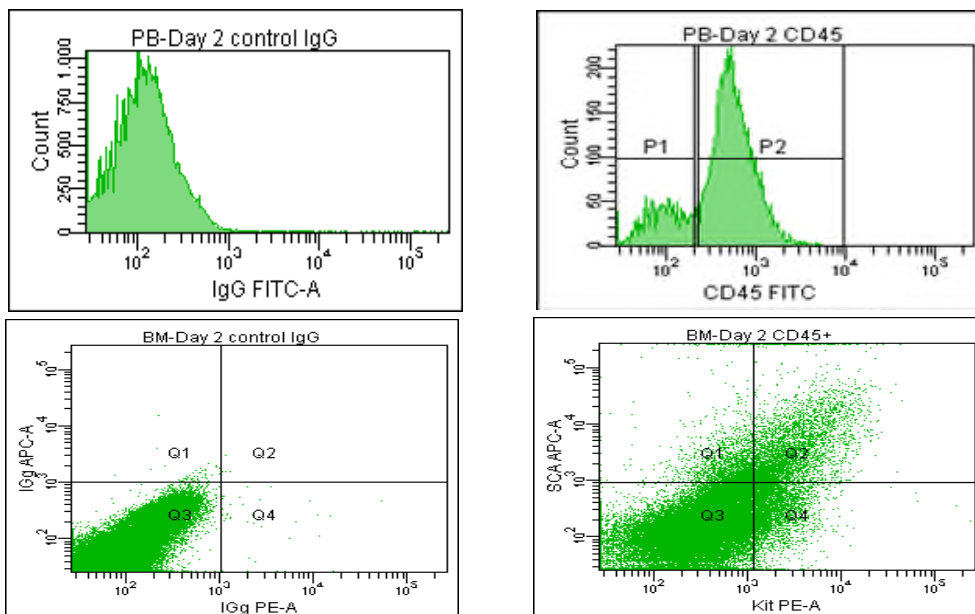


Figure 40: Evolution du nombre de CPH, CPM et PE dans la MO et dans le SP chez des souris injectées pendant 1 à 10 jours avec du G-CSF. Les statistiques sont données par comparaison aux valeurs des souris non traitées (J0) : * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.



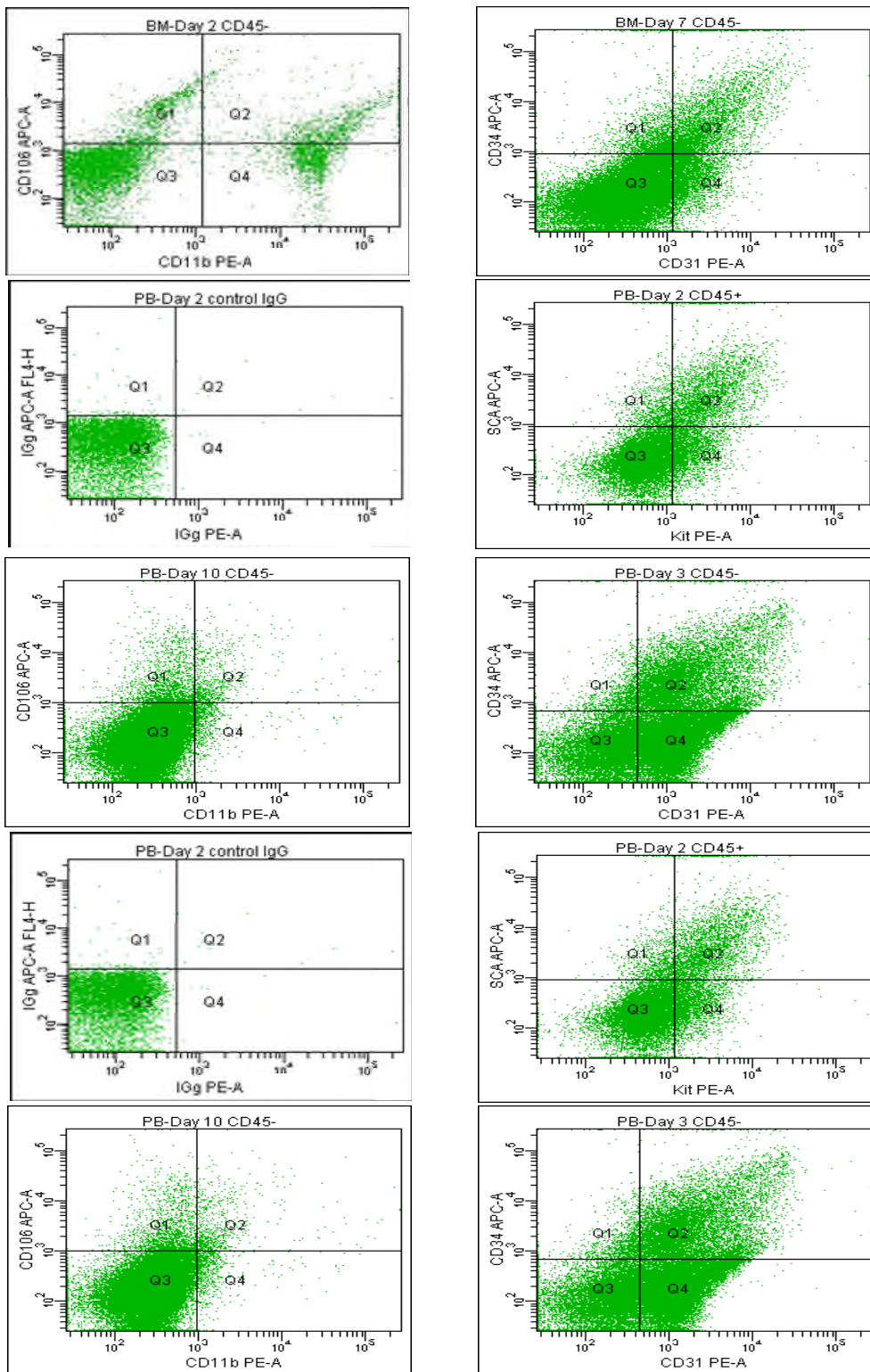


Figure 41: Exemple d'analyse en cytométrie de flux des CS dans la MO (BM) et C. dans le SP (PB) chez des souris injectées de 1 à 10J avec du G-CSF. La 1^{ère} étape consiste à sélectionner les cellules mononuclées ; la seconde consiste à sélectionner les cellules exprimant ou non le CD45 et la 3^{ème} étape consiste à étudier l'expression de combinaisons d'antigènes spécifiques aux 3 types de progéniteurs. Les phénotypes étudiés sont pour les CPH : $CD45^+Kit^+Sca^+$; pour les CPM : $CD45^+106^+11b^+$; pour les PE : $CD45-34^+31^+$.

3.2.1.3. Evaluation du potentiel clonogénique des cellules progénitrices (Fig. 42)

Le nombre de CFU-GM dans la MO est maximum les jours 2 et 7 (NS) et leur mobilisation dans le SP est évidente à partir du 2^{ème} jour de traitement. Dans la MO, le nombre de CFU-F diminue considérablement après le jour 2, tandis que leur nombre dans le SP augmente nettement au même moment et demeure à un niveau constant, avant de rejoindre des valeurs basales à la fin de l'expérience. Le profil d'évolution des CFU-F est assez proche de celui observé pour les CPM par FACS ; toutefois, le nombre de CPM détectées dans le SP reste élevé jusqu'au dernier jour, alors que celui des CFU-F diminue fortement à partir du J6. Nous avons également déterminé par cytométrie de flux le phénotype des cellules formant les CFU-F: 35% des CFU-F expriment le CD106 et 56% le Sca1.

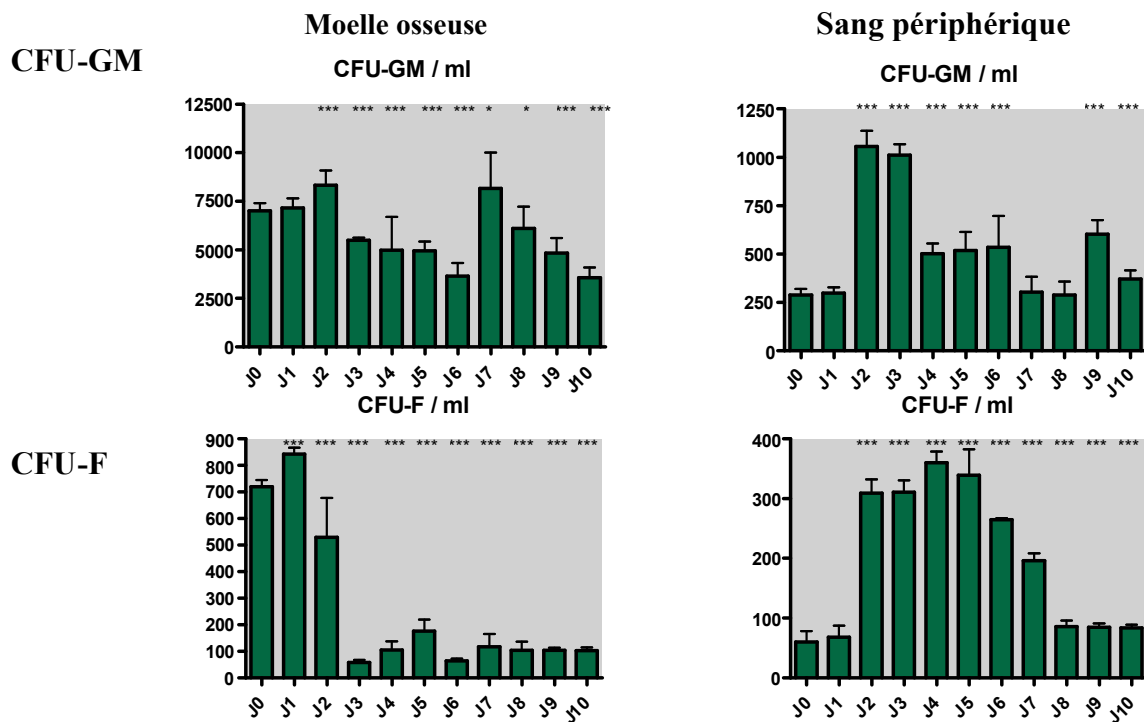


Figure 42: Evolution du nombre de CFU-GM et de CFU-F dans la MO et dans le SP chez des souris injectées pendant 1 à 10 jours avec du G-CSF. Les statistiques sont données par comparaison aux valeurs de souris non traitées (J0) : * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001.

3.2.2. G-CSF et tissu cardiaque sain

3.2.2.1. Poids du cœur

Nous n'avons observé aucune modification du poids du cœur ou du rapport poids de cœur sur poids corporel total chez les animaux sains traités de 1 à 10 jours par des injections sous-cutanées de G-CSF (Fig. 43).

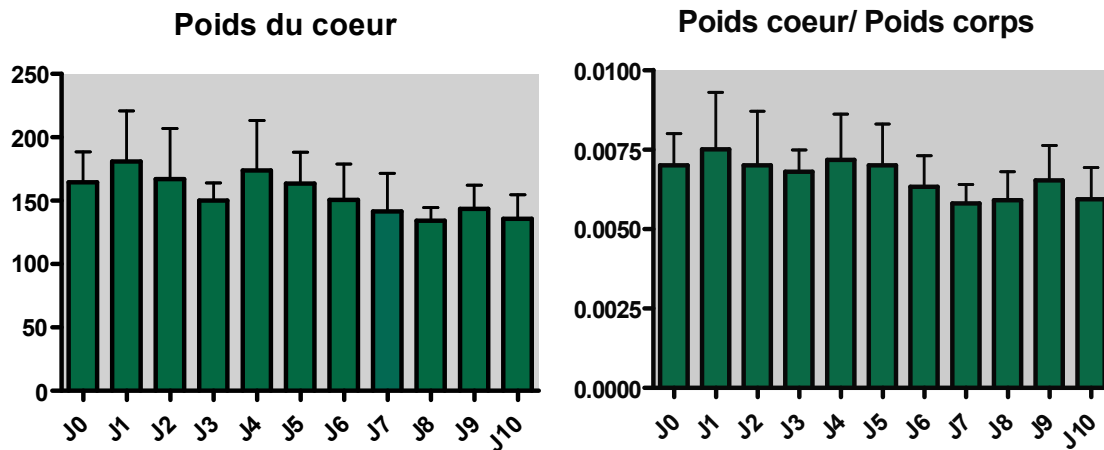


Figure 43: Poids du cœur (mg) et ratio poids du cœur/ poids corporel total chez des souris injectées pendant 1 à 10 jours avec du G-CSF.

3.2.2.2. Perfusion cardiaque

Nous avons évalué la perfusion du myocarde par imagerie μ SPECT et avons constaté que chez les souris traitées, la fixation moyenne du traceur radioactif dans le ventricule gauche est de $1.21 \pm 0.56\%$ de l'activité injectée au jour 0, et $1.48 \pm 0.62\%$ de l'activité au jour 10 ($p=0.020$). Ces valeurs résultent d'une augmentation hétérogène de la fixation, variant d'une souris à l'autre de 10 % à 86 %. La moyenne de l'augmentation de l'activité dans le cœur est de 30%. Chez les souris non traitées, la fixation du radiomarqueur dans le ventricule gauche ne varie pas entre le jour 0 et le jour 10. Nous avons ensuite réalisé des immunomarquages sur les cœurs prélevés au jour 10 et avons dénombré un nombre d'artérioles CD31-positives plus élevé (NS) chez les souris injectées pendant 10 jours avec du G-CSF (2.48 ± 0.72), que dans le groupe d'animaux contrôles (1.95 ± 0.65) (Fig. 44).

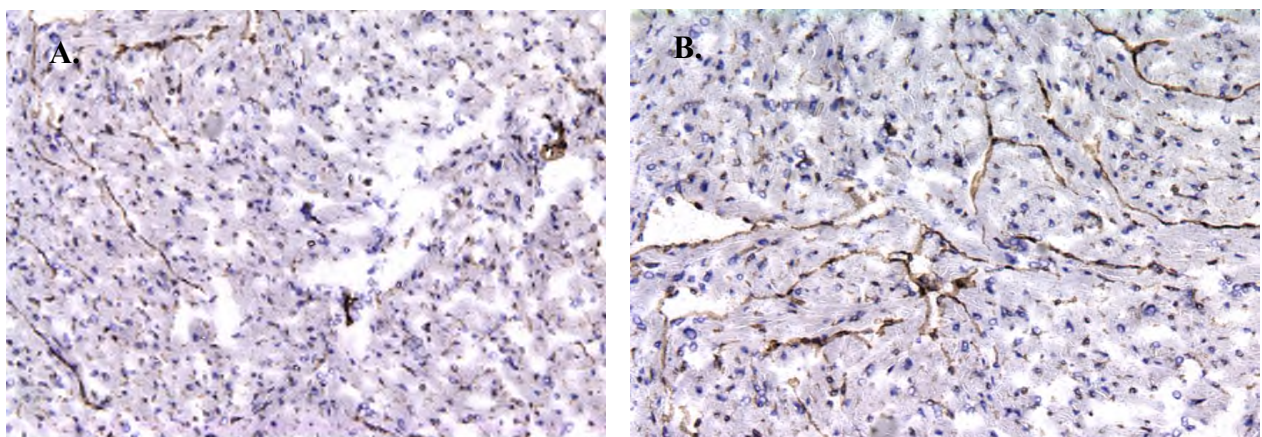


Figure 44: Mise en évidence des artérioles CD31+ par immunohistochimie **A.** chez des animaux non traités et **B.** chez des souris injectées pendant 10 jours avec du G-CSF.

3.2.2.3. Fonction myocardique

Les dimensions et la fonction du VG ont été évaluées en échocardiographie au jour 1 après l'arrêt de l'administration du G-CSF ou du tampon salin (tableau 8). La FC était comparable dans les deux groupes. L'épaisseur de la paroi postérieure du VG (EPVG) ($p < 0.001$) et la fraction d'éjection du VG (LVEF) ($p < 0.05$) sont significativement inférieures chez les souris traitées par G-CSF. La déformation (ou strain) évaluée par Doppler tissulaire dans la paroi antérieure ($p < 0.01$) et postérieure ($p < 0.05$) est également réduite après 10 jours de G-CSF.

Tableau 8 : Paramètres échocardiographiques évalués au J1 après l'arrêt de l'administration du G-CSF ou du tampon salin

N=12	Tampon salin	G-CSF x 10 j
FC (bpm)	236 ± 92	271 ± 51
DIVGd (mm)	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.2
DIVGs (mm)	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.4
EPVGd (mm)	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1 ***
ESIs (mm)	0.88 ± 0.1	0.86 ± 0.1
FEVG (%)	66.1 ± 3.2	59.9 ± 3.7 *
DC (µl/sec)	217 ± 71	208 ± 88
Strain pa (%)	34.5 ± 6.8	21.8 ± 4.4 **
Strain pp (%)	29.8 ± 8.5	21.2 ± 6.5 *

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; DIVGd = dimensions internes du VG en fin de diastole ; DIVGs = dimensions internes du VG en fin de systole; EPVG = épaisseur de la paroi postérieure du VG ; ESIs = épaisseur du septum interventriculaire en systole; FEVG = fraction d'éjection du ventricule gauche; DC = débit cardiaque; strain pa = strain dans la paroi antérieure du VG ; strain pp = strain dans la paroi postérieure du VG.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Des données hémodynamiques ont été acquises par cathétérisme cardiaque le 2^{ème} jour après l'arrêt de l'administration du G-CSF ou du tampon salin, dans les conditions basales et après réduction de la précharge (tableau 9). La pression en fin de systole et de diastole est plus élevée après 10 jours de G-CSF ($p < 0.01$). La constante de relaxation Tau-w est augmentée au-delà des valeurs normales ($p < 0.05$) tandis que l'élastance tend à être inférieure après l'injection de G-CSF (NS). Les autres paramètres hémodynamiques ne sont pas modifiés.

Tableau 9 : Evaluation de la fonction du VG par mesure des boucles pression-volume le 2^{ème} jour après l'arrêt de l'administration du G-CSF ou du tampon salin, dans les conditions basales et après réduction de la précharge.

N=12	Tampon salin	G-CSF x 10 j
FC (bpm)	258 ± 60	282 ± 74
PFS (mm Hg)	85.2 ± 9.4	97.2 ± 11**
PFD (mm Hg)	15,3 ± 10.5	31.6 ± 5.2**
VFD (µL)	54.7 ± 38.1	68.9 ± 24.0
TM (µL)	28.1 ± 10.5	26.3 ± 13.9
VM (mmHg*µl)	1636 ± 764	1589 ± 643
Tau-w (msec)	13.2 ± 2.8	23.6 ± 14.3*
Ees (mmHg/ml)	2.2 ± 1.2	1.7 ± 1.5

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; PFS = pression de fin de systole ; PFD = pression de fin de diastole ; VFS = volume de fin de systole ; TM travail myocardique ; VM = volume myocardique ; Tau-w = constance de relaxation mesurée par la méthode « Tau-Logistic » ; Ees = élastance.

* p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001.

3.2.3. Mises au point de la détection des cellules progénitrices et de leurs colonies chez des patients sains

Nous avons aussi déterminé la cinétique de mobilisation des cellules progénitrices par du G-CSF mais aussi de l'érythropoïétine (Epo), chez un nombre limité de sujets sains. Nous avons voulu déterminer s'il était possible de détecter ces cellules très rares de façon spécifique et reproductible. Pour ce faire, nous avons commencé une étude clinique dans laquelle deux sujets sains seront injectés l'un avec du G-CSF et l'autre avec de l'Epo.

3.2.3.1. Cellules mononuclées médullaires et sanguines

Nous observons une augmentation du nombre de globules blancs dans le sang périphérique à partir du 3^{ème} jour du traitement par le G-CSF et ce nombre est maximum au J8. Chez le patient ayant reçu de l'Epo, le nombre de cellules mononuclées du SP montre un léger pic au J8. Au J8, les globules blancs dans la MO sont 5 fois plus nombreux après injection G-CSF, et 10 fois après un traitement par de l'Epo (Fig.45).

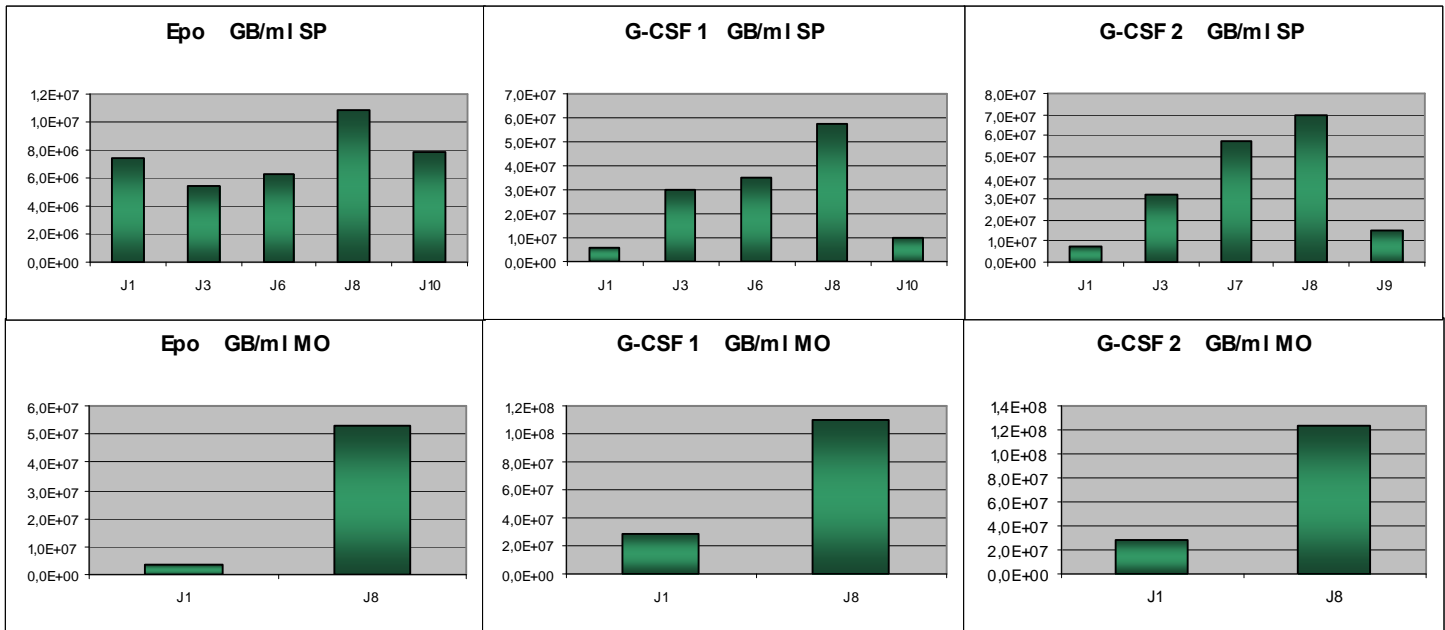


Figure 45: Evaluation du nombre de globules blancs au J1, J3, J6, J8 et J10 et de la MO au J1 et J8 chez 1 patient mobilisé par de l'Epo et chez 2 patients recevant quotidiennement du G-CSF.

3.2.3.2. Détection des progéniteurs par cytométrie de flux

Afin de contourner les difficultés inhérentes à la détection de cellules d'intérêt, présentes à une très faible fréquence, nous avons du mettre au point un protocole et une stratégie de « gating » adaptés. La première étape consiste à sélectionner les cellules mononucléées sur un « Dot plot » dont les axes représentent en abscisse la granularité et en ordonnée, la taille des cellules. Malgré une étape préalable de purification des cellules mononucléées sur un gradient de densité et avec une lyse des globules rouges, il reste systématiquement des globules rouges contaminants que nous éliminons par « gating ». Ensuite, la sélection se base sur l'expression de l'antigène CD45 : les cellules positives sont sélectionnées pour l'étude des CPH, les négatives pour l'analyse des CPM et les CD45^{low} pour la détection des PE. Nous utilisons ensuite le canal du FITC pour exclure les cellules qui expriment une série d'antigènes négatifs chez les cellules progénitrices étudiées. Nous appelons ce canal le « Dump ». Nous avons ainsi trié une population de cellules négatives pour le CD3, 14, 15, 19 et 56, sur laquelle nous analysons l'expression d'antigènes spécifiques aux différents types de progéniteurs. En résumé, les phénotypes étudiés sont pour les CPH : CD45⁺KDR⁺133⁺ ou CD45⁺34⁺31⁻ ; pour les CPM : CD45⁻73⁺90⁺; et pour les CPE : CD45^{low}34⁺31⁺ (Fig. 46).

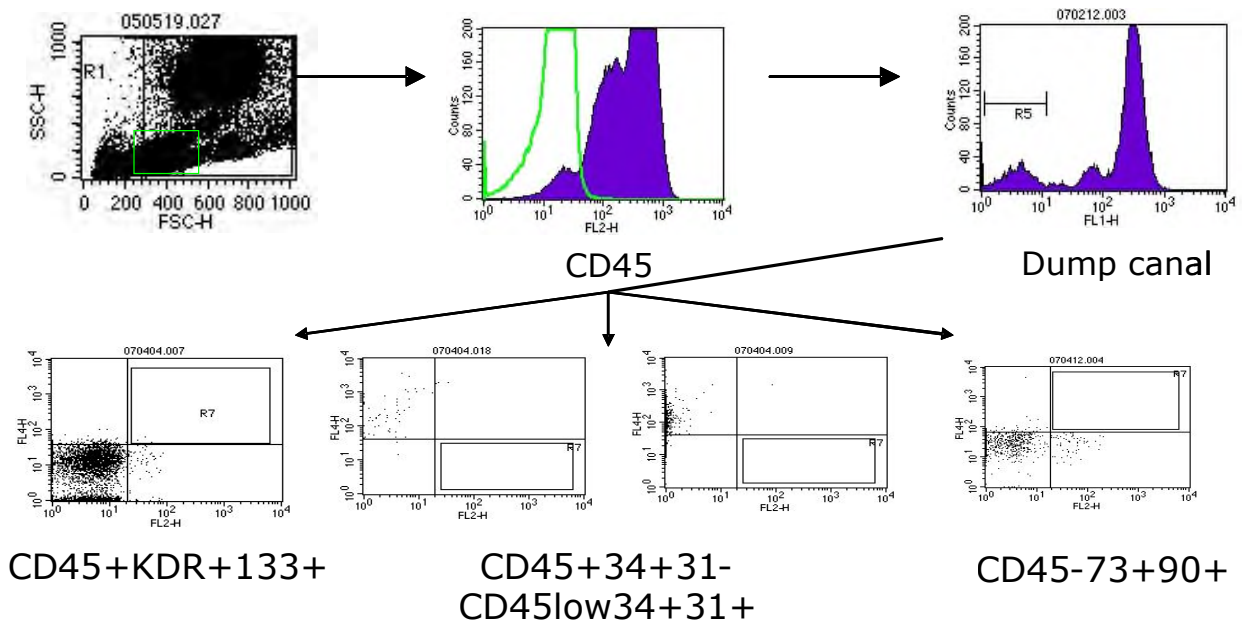


Figure 46: Stratégie de gating utilisée en cytométrie de flux afin de détecter les populations rares de CPH, CPM et PE. La 1^{ère} étape consiste à sélectionner les cellules mononuclées ; la seconde consiste à sélectionner les cellules exprimant ou non le CD45 ; la 3^{ème} à éliminer les cellules positives dans le « Dump canal » ; enfin, la 4^{ème} consiste à étudier l’expression de combinaisons d’antigènes spécifiques aux 3 types de progéniteurs.

En appliquant ce protocole, nous pouvons observer une augmentation du nombre de CPH, CPM et PE dans le SP et la MO et ce, pour les deux types de traitement. Toutefois, l’accroissement semble plus important chez les deux patients ayant reçu du G-CSF. Le nombre de CPH et de CPM est maximum au J8 alors que pour les PE, c’est au J6 qu’il est le plus élevé. La figure 47 donne un exemple de ce que nous observons en cytométrie de flux dans le SP.

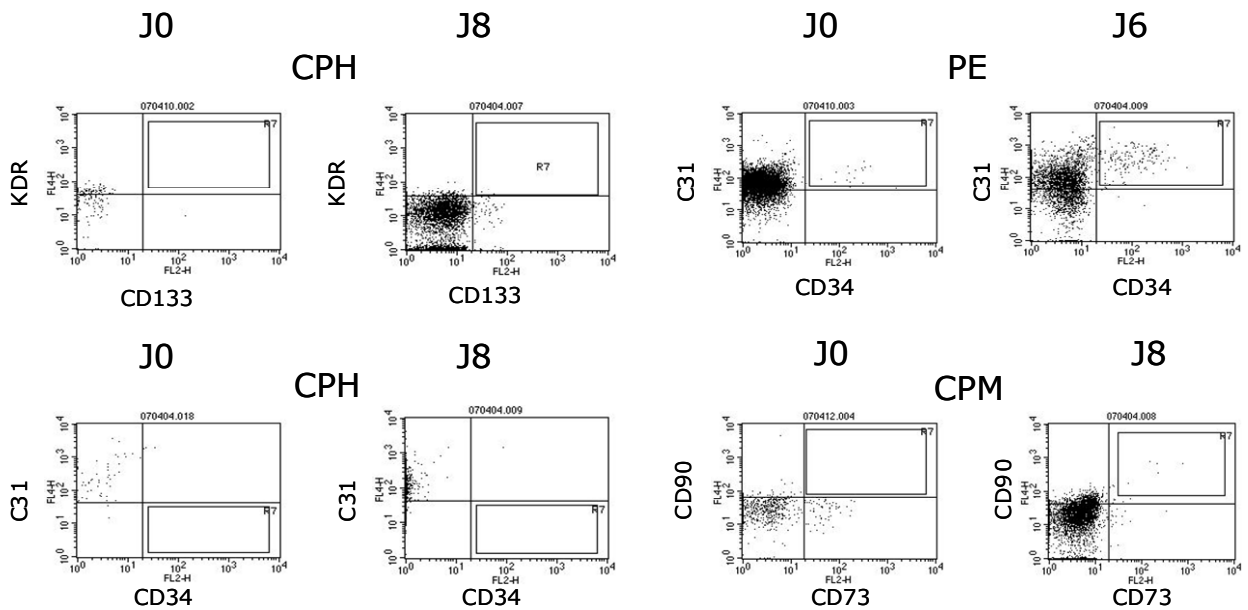


Figure 47: Exemples de résultats obtenus en cytométrie de flux sur le SP d’un patient mobilisé par du G-CSF, au J8 pour les CPH et CPM, et au J6 pour les PE. Les phénotypes étudiés sont pour les CPH : CD45⁺KDR⁺133⁺ ou CD45⁺34⁺31⁻ ; pour les CPM : CD45⁻73⁺90⁺ ; pour les PE : CD45^{low}34⁺31⁺.

3.2.3.3. Analyse du potentiel clonogénique des cellules progénitrices (Fig.48)

De façon assez parallèle à l'analyse par FACS, lorsque nous dénombrons les colonies CFU-GM formées ou les CFU-F, nous pouvons observer une augmentation du nombre de colonies dans le SP et la MO, et ce, pour les deux types de traitement. Toutefois, l'accroissement semble plus important chez les deux patients ayant reçu du G-CSF. Le nombre de CFU-GM et de CFU-F est maximum après 8 jours de traitement.

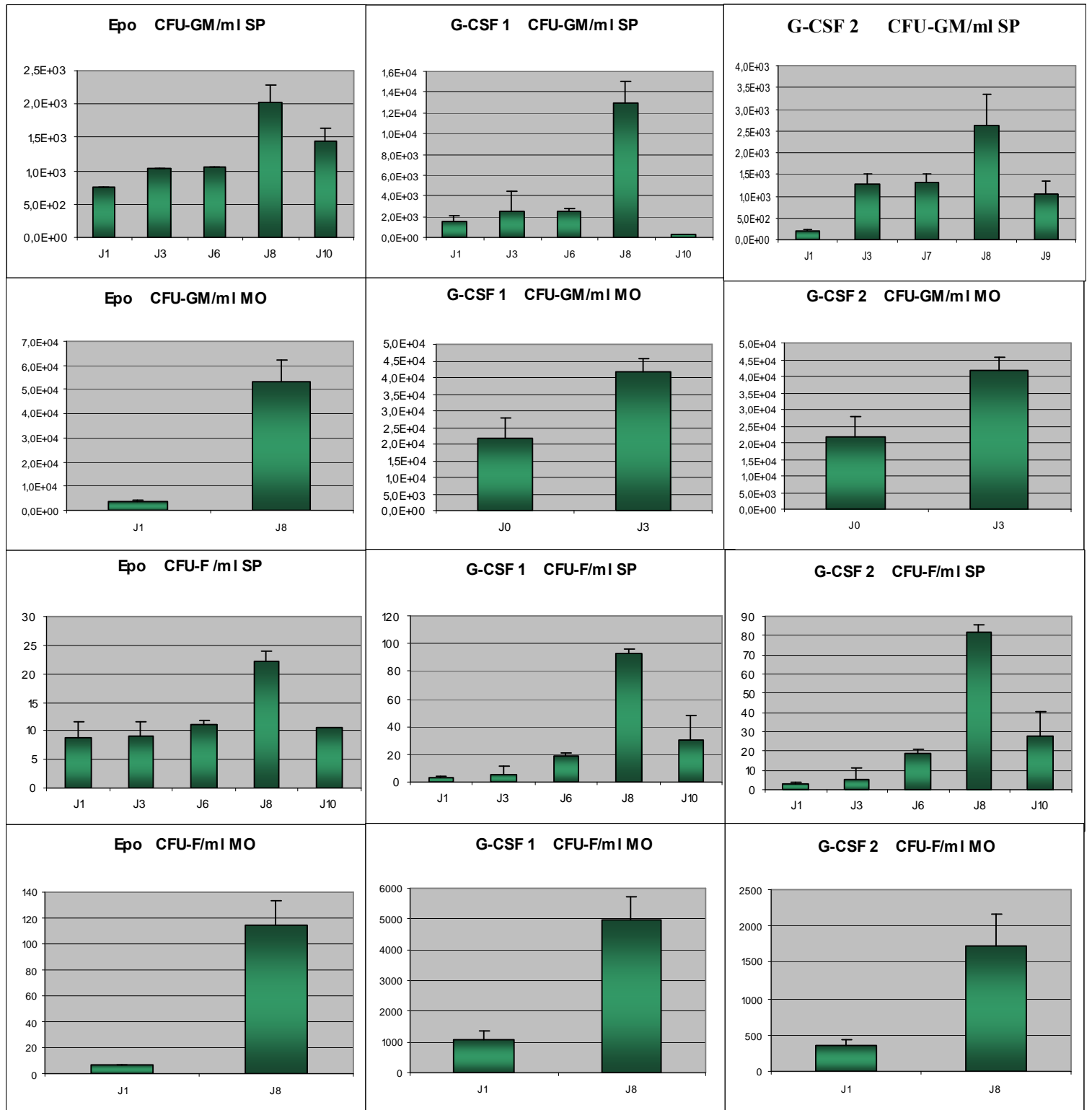


Figure 48: Evaluation du nombre de CFU-GM et CFU-F du SP au J1, J3, J6, J8 et J10 et de la MO au J1 et J8 chez 1 patient mobilisé par de l'Epo et chez 2 patients administrés quotidiennement avec du G-CSF

3.2.3.4. Standardisation des tests de formation de colonies à partir des PE dans le SP et dans la MO

3.2.3.4.1. “Endothelial cell colony-forming units” (CFU-EC)

Nous avons tout d’abord appliqué le protocole le plus couramment utilisé pour le dénombrement des CFU-EC formées à partir des cellules non adhérentes, obtenues après culture dans le milieu « Endocult » et selon les instructions de la firme. Nous observons une augmentation du nombre de colonies formées à partir des cellules du SP chez les patients recevant de l’Epo ou du G-CSF, et ce à partir du 3^{ème} jour, avec un pic au 6^{ème} jour, suivi d’un retour à l’état basal (Fig. 49).

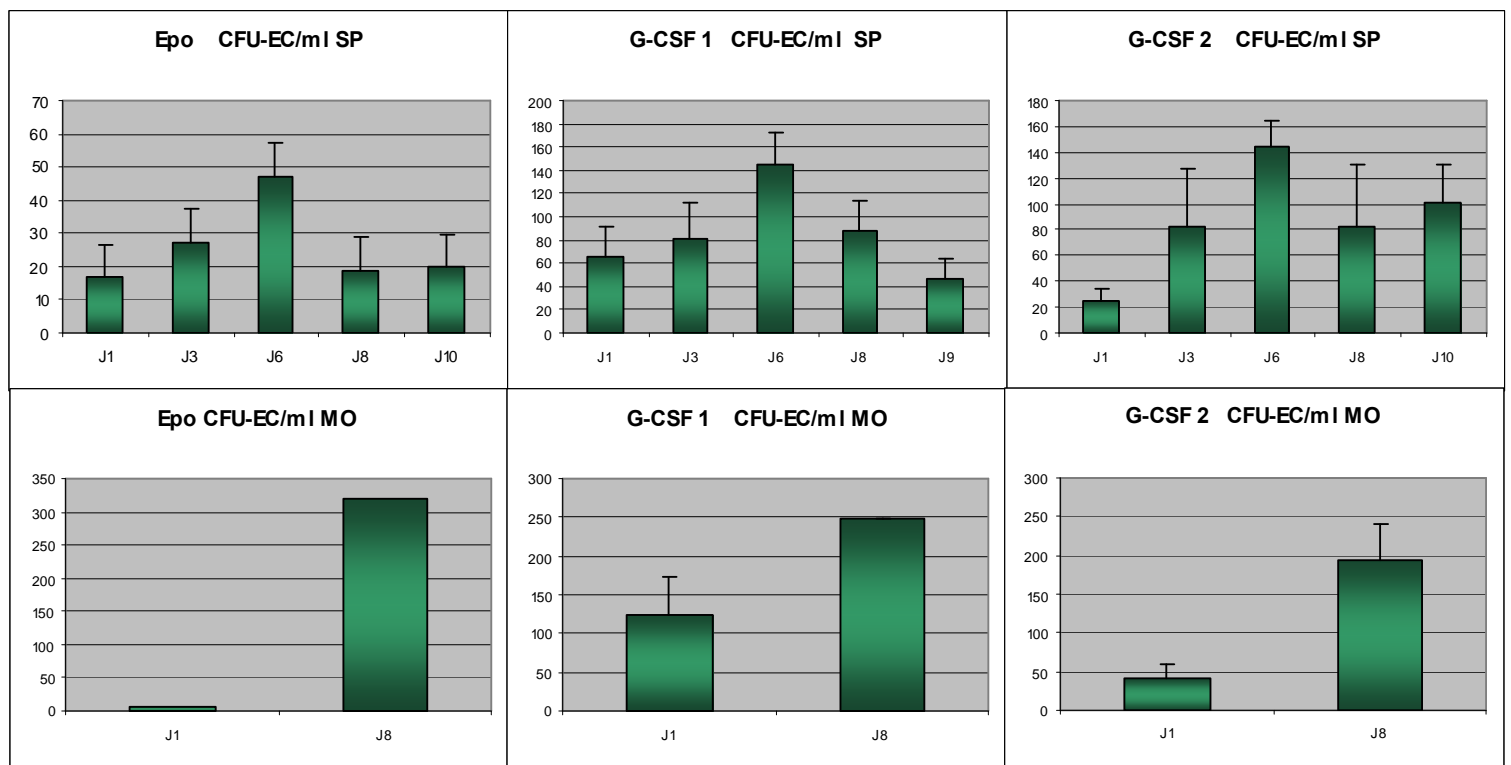


Figure 49: Evaluation du nombre de CFU-EC du SP aux J1, J3, J6, J8 et J10 et de la MO aux J1 et J8 chez 1 patient mobilisé par de l’Epo et chez 2 patients recevant quotidiennement avec du G-CSF

3.2.3.4.2. “Endothelial colony forming cells” (ECFC)

Nous avons ensuite dénombré les ECFC formées à partir des cellules adhérentes cultivées dans le milieu EBM-2. Bien que nous observions également une augmentation du nombre de colonies formées à partir des cellules du SP des patients mobilisés, les ECFC sont environ 10 fois plus rares que les CFU-EC.

3.2.3.4.3. CFU-EC versus ECFC

Nous avons ensuite comparé la morphologie et le phénotype des deux types de colonies descendant des PE. Les CFU-EC se composent au centre de cellules rondes, entourées par des cellules d'aspect fibroblastique, alors que les ECPC sont des petites colonies très compactes de cellules arrondies (Fig. 50). Le phénotype des cellules qui composent les CFU-EC pourrait se rapprocher de la lignée macrophagique ; en effet, ces cellules sont CD45⁺, CD34⁻, CD31⁻ et CD11b⁺. Les ECPC, quant à elles, se composent de cellules CD45⁻, CD34⁻, CD31⁺ et CD11b⁻.

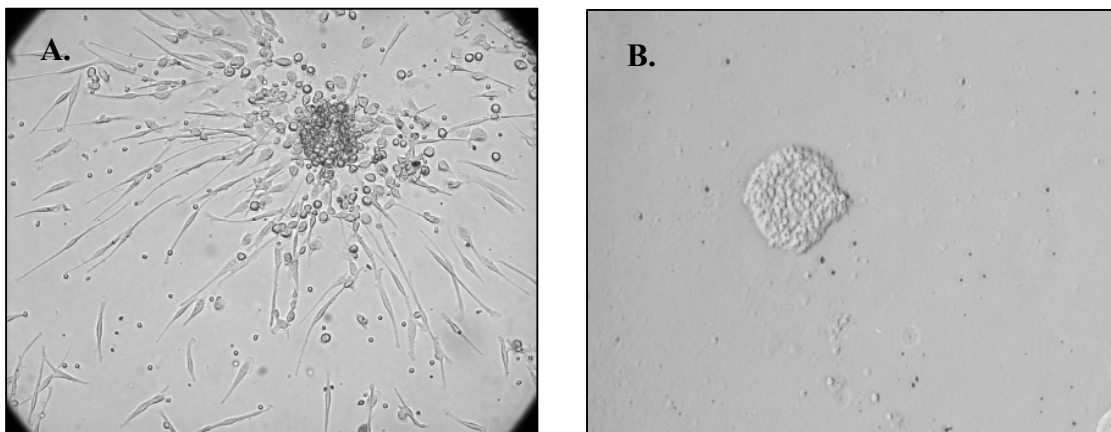


Figure 50: Observation en microscopie à contraste de phase **A.** d'une CFU-EC et **B.** d'une ECPC

3.3. Discussion

La mobilisation des CS dans le SP par le G-CSF est devenue un procédé standard pour améliorer la transplantation clinique des CSH. Cependant, relativement peu de données sont disponibles au sujet de la cinétique de mobilisation des cellules progénitrices hématopoïétiques, et surtout mésenchymateuses ou endothéliales. L'impact d'un traitement prolongé par du G-CSF sur le pool de CS de la MO a été peu investigué.

3.3.1. Chez la souris

Dans cette troisième partie de notre travail, nous avons observé que le G-CSF induit une augmentation de l'hématocrite dès le 1^{er} jour de traitement et que ce paramètre reste plus élevé chez les souris mobilisées tout au long du traitement. L'augmentation des neutrophiles dans le SP est maximum au 3^{ème} jour de traitement, avant de retourner à des valeurs basales. Le nombre de globules blancs de la MO diminue entre le 1^{er} et le 4^{ème} jour de traitement et

reste inférieur aux valeurs des souris non traitées tout au long de l'étude : cette évolution est l'image inversée des variations de GB dans le SP. Nous pouvons donc en déduire que la niche des CSH de la MO occupe une fonction très importante lors de la mobilisation.

Peu de données sont disponibles au sujet de la cinétique respective de la mobilisation des CPH, CPM et PE et de l'impact de 10 jours de G-CSF sur leurs pools dans la MO. Chiang et al. ont évalué l'impact de l'administration de 5 jours de G-CSF sur les CS hématopoïétiques de la MO chez des volontaires sains. Ils ont montré que le nombre total de cellules nucléées et le nombre absolu de cellules CD34⁺/ml suivent un profil similaire de réponse dans la MO et dans le SP, avec un pic au jour 6. De plus, ils ont observé une up-régulation de la sous-unité de l'intégrine $\alpha 4$ alors qu' $\alpha 5$ était plus exprimée après le traitement par du G-CSF. Cette modification de l'expression des molécules d'adhésion est corrélée à la mobilisation des cellules CD34⁺²²⁸. La capacité de homing des cellules progénitrices est influencée par les variations d'expression des intégrines very late antigen (VLA)-4 et -5²²⁹. Nous avons ensuite examiné plus attentivement l'impact d'un traitement de 10 jours de G-CSF sur la mobilisation des cellules progénitrices. Les phénotypes choisis pour analyser les CPH²³⁰, CPM²⁰⁷ et CPE^{231,232} sont tout à fait standard. Le nombre de CPH dans la MO est resté stable tout au long de l'étude, à l'exception de deux pics apparaissant aux J2 et J7, suivis chaque fois d'une augmentation importante de ces cellules dans le SP. Le nombre de CFU-GM obtenu à partir des cellules de la MO montre un profil semblable présentant également 2 pics au J2 et J7, tandis que les CFU-GM formées par les cellules du SP sont plus élevées chez les souris traitées à partir du 2^{ème} jour.

Nous avons observé une mobilisation dans le SP des CPM à partir du 2^{ème} jour, avec un nombre constant de ces cellules jusqu'au J10, tandis que le nombre de CPM de la MO est maximum au J2, avant de diminuer progressivement. Ces fluctuations ont été confirmées par le dénombrement des CFU-F dans le MO et le SP ; néanmoins, nous pouvons observer une discordance entre le nombre de CPM obtenu en cytométrie et les CFU-F formées à partir des cellules sanguines, puisque ces dernières augmentent effectivement au J2, restent constantes jusqu'au J7, avant de revenir à des valeurs identiques à celles des souris non traitées.

De plus, l'analyse par cytométrie de flux des cellules CD45+CD106-CD11b- peut détecter une population mixte de CPM et CPE et il aurait pu être intéressant de constater l'absence d'expression du CD31 dans cette population pour s'assurer d'exclure les cellules endothéliales. Néanmoins, nous avons vérifié sur des cellules triées CD45+CD106-CD11b- que ces dernières formaient un grand nombre de CFU-F et pouvaient se différencier en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes. Toutefois, nous convenons que cela n'exclut pas la présence de cellules endothéliales dans ce phénotype. D'autre part, les cinétiques de la CPM et

des CPE sont complètement différentes, et l'évolution des CPM dans le SP et la MO est plus proche de celle des CFU-F que de celle des CPE. Ceci suggère que la majorité des cellules CD45+CD106-CD11b- sont probablement des CPM plutôt que des cellules endothéliales.

Nous avons aussi constaté une mobilisation importante des CPE aux J3 et J4, qui se stabilisent par la suite à un taux intermédiaire. Dans la MO, les CPE augmentent graduellement pour atteindre une concentration maximale au 7^{ème} jour de G-CSF, et enfin revenir à des valeurs basales. Nous ne disposons malheureusement pas actuellement de tests fonctionnels fiables nous permettant de mettre en évidence chez la souris les colonies formées à partir des progéniteurs endothéliaux.

Si la mobilisation des CPH est aujourd'hui bien établie, la détection des CPM et CPE dans le SP, ainsi que la possibilité de mobiliser ces cellules par du G-CSF, restent un sujet de controverse⁹⁴. Ces discordances entre études peuvent s'expliquer par des différences entre les techniques de prélèvement et les méthodes de culture, ainsi que par le peu de techniques de sélection et de marqueurs spécifiques décrits pour identifier les CPM et CPE. Néanmoins, plusieurs études ont pu détecter des CPM dans le SP^{204,233-235}: par exemple, Kassis et al. ont utilisé des microbilles coâtées de fibrine sur des cellules du SP de donneurs sains mobilisés par du G-CSF²³⁶. Liu et al. ont également mis en évidence ces cellules dans le sang périphérique de donneurs sains humains mobilisés par G-CSF²⁰⁴. Tatsumi et al. quant à eux, ne détectent pas de CPM dans le SP dans des conditions physiologiques mais observent une forte mobilisation de ces cellules en périphérie après un traitement de 9 jours par du G-CSF²³⁷. D'autre part, Lund et al. ont pu mettre en évidence un plus grand nombre de CFU-F, formé à partir de CSM, dans le SP de volontaires mobilisés par du G-CSF ; cependant, les cellules constituant ces colonies possédaient une capacité d'expansion *in vitro* limitée, probablement due à une sénescence accélérée, secondaire à un raccourcissement important de leurs télomères²³⁸.

Ces 5 dernières années ont permis d'accumuler de nombreuses preuves de la présence de CPE dans le SP. Bien qu'initialement plus rare dans le sang de patients souffrant de maladie cardiovasculaire²³⁹, le nombre de ces cellules augmente dans le SP en réponse à des lésions ischémiques et les premières indications suggèrent qu'elles pourraient être mobilisées par des cytokines telles que le G-CSF^{162,231}, le GM-CSF²⁴⁰ ou l'Epo²⁴¹. Cependant, des combinaisons diverses de marqueurs ont été employées pour identifier ces supposées CPE, et ce, de façon indépendante de l'expression du CD45. Les résultats qui en découlent ont donc abouti à des données hétérogènes en cytométrie de flux. Il est maintenant clairement établi que la détection de l'antigène CD45 est recommandée pour l'énumération au FACS des CPE et que la capacité clonogénique endothéliale constitue *in vitro* une caractéristique essentielle à

évaluer. Malheureusement, dans les modèles murins, les techniques de culture et de détection des « colony-forming unit endothelial cells » (CFU-EC) n'ont pas encore été validées.

La mobilisation des CS est associée à des changements importants de l'expression et de la fonction des molécules d'adhésion à la surface des cellules. Ceci suggère que la libération des cellules dans le SP nécessite que les interactions entre les CS et le stroma médullaire qui maintiennent les CS dans la MO dans les conditions physiologiques soient modifiées²⁴². Il a été démontré récemment que les interactions entre CS et stroma médullaire durant la mobilisation peuvent être perturbées par la libération de protéases par les ostéoblastes et les neutrophiles^{114,243}. Les différences de cinétique observées entre les CPH, CPM et CPE lors de leur mobilisation peuvent être dues à un pattern d'expression des molécules d'adhésion différent à la surface des 3 types de CS.

Du point de vue des mécanismes moléculaires de mobilisation des CS, le G-CSF induit une augmentation transitoire de SDF-1 qui entraîne la prolifération et l'activation des neutrophiles et des ostéoclastes. La libération d'enzymes protéolytiques provoque le détachement de la membrane du SCF, la modification des l'interaction VCAM-1/VLA-4, la prolifération des cellules souches, l'augmentation de l'expression de CXCR4 et l'inactivation de SDF-1. Ces modifications de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhérence entraînent la libération de précurseurs en circulation. Le G-CSF semble donc en mesure de mobiliser les cellules en fonction de leur expression de CXCR4 et a donc une influence notamment sur les CPH, les CPM et les CPE¹²¹⁻¹²². Toutefois, Pitchford et al. ont décrit une mobilisation différentielle des sous-ensembles de cellules progénitrices de la moelle osseuse par les molécules qui régulent la rétention cellulaire, le cycle cellulaire et la prolifération²³⁰. En effet, la mobilisation des CPH est maximale lorsqu'un antagoniste du CXCR4 est administré à des souris prétraitées avec le G-CSF, alors que la mobilisation des CPE est sous-maximale. En revanche, lorsque les souris ont été prétraitées avec du VEGF, l'administration d'un antagoniste de CXCR4 augmente la mobilisation des CPE et supprime celle des CPH.

Pour cette étude, nous avons employé une dose de G-CSF de 50 µg/kg, en nous référant à l'étude de Bungart et al. qui ont démontré que cette concentration donne la meilleure dose-réponse en se basant sur les CS mobilisées en périphérie et les CFU-GM formées²⁴⁴. L'administration répétée (12 cycles de 5 jours) de G-CSF recombinant de souris (rmG-CSF) n'a pas affecté la capacité de mobilisation et le nombre de CFU-GM formées à partir de la moelle. L'injection de G-CSF ne semble donc pas mener à l'appauvrissement de la MO. Cependant, un protocole identique utilisant du « G-CSF recombinant humain » (rhG-CSF) a abouti à une forte inhibition de la mobilisation due à l'apparition d'anticorps anti-rhG-CSF²⁴⁵.

Il n'est pas à exclure que la dose de G-CSF utilisée (50µg/kg par jour) ne soit pas optimale. Le G-CSF humain recombinant est produit chez l'Escherichia. coli et n'est pas glycosylé. Par conséquent, la molécule est très sensible aux protéases des neutrophiles, et est rapidement dégradée in vivo chez la souris. Les doses d'au moins 250µg/kg en une seule injection quotidienne, ou en deux doses quotidiennes fractionnées de 125µg/kg chacune semblent produire un effet maximal chez la souris²⁴⁶. Cette dose sous-optimale peut expliquer que les CPH et les CFU-GM augmentent au jour 2, puis diminuent rapidement. Si nous avions obtenu une saturation en G-CSF, la mobilisation aurait été maximale et aurait formé un plateau entre les jours 3 et 6 du traitement par le G-CSF. De plus, la concentration en CFU-GM au moment du pic de mobilisation est quatre fois supérieure à celle observée chez les animaux non mobilisés : cette concentration pourrait être 20 à 100 fois plus élevée. Molineux et al²⁴⁶ ont examiné l'effet de différentes doses de G-CSF sur les neutrophiles du sang. Aux jours 1 et 2, la dose de 50µg/kg semble être plus efficace que celle de 250µg/kg au jour 3. Ces doses sont équivalentes et, au jour 4 la dose de 250µg/kg semble optimale. Aucune donnée comparative n'est disponible au delà de 4 jours de traitement. De plus, il n'y avait aucune comparaison fournie entre les différentes doses de G-CSF pour la mobilisation des cellules progénitrices. Dans la littérature, les différents auteurs ont utilisé des doses allant de 10 à 300µg/kg de G-CSF pour la mobilisation des cellules souches chez des volontaires sains ou chez des souris ischémiques. Nous avons choisi la dose de 50 µg/kg afin de pouvoir comparer nos résultats avec les modèles précédents de mobilisation des cellules progénitrices après infarctus du myocarde chez la souris : nous le développons dans le chapitre suivant. Par exemple, Orlic et al. ont décrit que la mobilisation des CS suite à l'injection quotidienne de 50µg/kg de G-CSF pendant 5 jours a eu un impact positif sur la fonction cardiaque et la survie des souris après ligature de l'artère coronaire¹⁶². Kong et al. ont montré que la mobilisation des cellules progénitrices endothéliales, suite à des injections quotidiennes de 50µg/kg de G-CSF pendant 8 jours, induit une réparation accrue des artères lésées chez le rat¹⁷⁴. En conclusion, nous pensons que 50µg/kg de G-CSF est une dose validée. Toutefois, nous convenons que des doses plus élevées pourraient être testées lors d'expériences futures.

Dans nos expériences, nous n'obtenons pas une corrélation parfaite entre le nombre de CPH et de CPM détectées par cytométrie de flux et le nombre de CFU (CFU-GM et CFU-F respectivement) formés. Cela suggère que toutes les CPH et CPM ne sont pas à l'origine d'une colonie. Trois hypothèses, non mutuellement exclusives, peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, une activation du cycle cellulaire par le G-CSF serait à l'origine de la présence de cellules progénitrices à un stade plus différencié. En effet, dans des conditions physiologiques, la majorité des CS est maintenue dans la phase G0 du cycle cellulaire par le

biais d'interactions avec les cellules stromales de la MO²⁴⁷. Il est envisageable que les CS entrées dans un processus de mobilisation ne puissent plus former de CFU. Il est intéressant de noter que les cellules CD34⁺ de la MO cyclent plus rapidement, alors que les CS mobilisées dans le SP se composent d'un plus grand nombre de cellules quiescentes⁹⁵. Ensuite, une seconde hypothèse serait que les milieux de culture utilisés pour les essais clonogéniques ne soient pas appropriés pour la croissance de certains progéniteurs et ne contiennent pas l'ensemble des facteurs de croissance ou cytokines nécessaires. Enfin, lorsque les CSH et CSM sont mobilisées dans le SP, elles sont libérées de leurs interactions directes avec les cellules stromales médullaires, ce qui peut contribuer à la diminution de leur potentiel clonogénique. Toutefois, afin d'exclure une contamination par les macrophages ou les cellules endothéliales, nous avons effectué des doubles marquages CD45-CD14 ou CD45-CD31 sur les colonies CFU-F. Aucune cellule doublement positive n'a été détectée. De plus, l'analyse par cytométrie de flux des cellules qui constituent les CFU-F ont montré que ces colonies ne contiennent pas de cellules positives pour CD34 ou CD45, contiennent 2% de cellules CD11b⁺, 60% de cellules CD106⁺ SCA⁺ et 89% de cellules SCA⁺. Ces colonies sont donc composées essentiellement des cellules mésenchymateuses puisque les cellules CD106⁺ SCA⁺ ont le phénotype attendu pour les CPM et que les cellules CD106⁺ SCA⁺ peuvent contenir des précurseurs de ces cellules.

D'autre part, l'effet d'un traitement par du G-CSF sur la perfusion et les performances hémodynamiques d'un cœur normal n'a encore jamais été évalué. Nos résultats démontrent que la perfusion myocardique est augmentée de façon importante peu de temps après l'administration de G-CSF. L'analyse échocardiographique et les mesures de pression-volume ont démontré que l'administration de G-CSF a un impact sur la fonction hémodynamique cardiaque : l'EPVG, la FEVG et l'Ees sont diminués suite au traitement. Ce dernier paramètre reflète la contractilité du ventricule gauche et est donc en relation directe avec la fonction systolique globale. La constante de relaxation temporelle Tau-W reflète le processus actif et précoce de relaxation. Cette constante est augmentée après administration de G-CSF, indiquant une relaxation anormale du cœur, en accord avec les valeurs plus élevées de la PFS et de la PFD chez les souris traitées, et suggérant une compliance plus faible du VG. La mesure par Doppler tissulaire du strain dans les parois antérieures et postérieures donne des valeurs sensiblement plus faibles chez les souris recevant du G-CSF, ce qui reflète une plus faible déformabilité du myocarde. Sur base de ces résultats, il pourrait être proposé que G-CSF exerce un effet rigidifiant sur les parois ventriculaires. Ces résultats sont importants pour l'usage potentiel de G-CSF en médecine régénératrice cardio-vasculaire. En effet, le G-CSF pourrait favoriser la synthèse de collagène^{165,166} et les CSM semblent davantage acquérir des

caractéristiques de fibroblastes lorsqu'elles sont localisées dans un micro-environnement pro-fibroblastique^{248,249}. Le G-CSF induit également des modifications ultra-structurelles de la MO et de la rate, lesquelles facilitent la migration transendothéliale des CS de la moelle et le repeuplement de la rate, sans toutefois s'accompagner d'altérations de la morphologie des principaux organes hématopoïétiques²⁵⁰.

En conclusion, nous avons démontré que l'administration de G-CSF chez les souris induit la mobilisation en périphérie de CPH, CPM et CPE, selon une cinétique spécifique à chaque type de cellules progénitrices. C'est après 3 jours de traitement par du G-CSF que nous observons un nombre maximum des 3 types de progéniteurs dans la SP : ce serait donc le jour le plus approprié pour collecter par aphérèse une population enrichie en CPH, CPM et CPE. Toutefois, ce jour de collecte est à adapter spécifiquement à chaque type de cellules progénitrices. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que le G-CSF peut avoir un impact direct sur la perfusion et les performances hémodynamiques cardiaques.

De plus, il est important de noter que les résultats présentés dans ce chapitre ne peuvent être directement extrapolés à l'homme même si des similitudes existent entre les espèces. Par exemple, Kuznetsov et al. ont isolé des cellules « fibroblast-like » adhérentes, clonogéniques, avec un potentiel ostéogénique et adipogénique dans le SP de quatre espèces de mammifères, y compris les souris et les humains⁶. Bien que le profil phénotypique des CS dans les espèces soit assez similaire, l'expression de marqueurs de surface peut varier. De plus, des différences physiologiques existent également comme par exemple, la fréquence cardiaque qui est d'environ 600 battements /min chez la souris par rapport à celle de l'homme qui est de 80 battements/min.

3.3.2. Chez l'homme

Nous avons établi un protocole qui permet d'identifier et de suivre les variations de concentration des CPH, CPM et CPE dans la MO et le SP chez des sujets sains mobilisés par du G-CSF ou de l'Epo. La détection de ces cellules très rares n'étant pas aisée, ce protocole est basé non seulement sur une analyse en cytométrie de flux, mais également sur des tests fonctionnels clonogéniques et comporte plusieurs étapes clés. Tout d'abord, pour détecter les CPE en FACS, il est primordial d'inclure un marquage anti-CD45 permettant de les discriminer des CPH^{54,251}. De plus, afin d'affiner davantage la procédure de gating, nous excluons les agrégats grâce à un « Dot plot » FSC-W versus FSC-A, et avons également mis au point les marquages anti-CD36 et glycophorine A, qui seront ajoutés dans le dump canal afin d'éliminer avec certitude toute trace de globules rouges contaminants. Ensuite, nous

avons ajouté un anticorps dirigé contre le ganglioside neuronal GD2 au panel d'anticorps utilisés ; ce marqueur de surface a récemment été décrit pour la détection des CSM¹. Et enfin, nous avons mis au point des marquages au Hoechst et Draq5 permettant de déterminer les différentes étapes du cycle cellulaire. Le marquage Hoechst permet d'isoler les cellules viables alors que Draq5 nous permet de sélectionner les cellules nucléées^{252,253}. Il est également important de déterminer clairement le protocole optimal permettant de détecter les colonies formées à partir des CPE. Plusieurs publications suggèrent que les progéniteurs les plus précoces se trouvent dans le pool des cellules adhérentes^{254,255}.

Maintenant que le protocole est bien établi, nous pouvons débiter une étude clinique en aveugle sur une cohorte importante. Par la suite, nous pourrions réaliser une étude comparable chez des patients atteints de cardiomyopathie chronique ou aigue stabilisée et évaluer l'impact de la mobilisation, soit par du G-CSF, soit par de l'Epo, soit par une combinaison des deux, des cellules souches sur leur fonction cardiaque.

<i>Résultats Chapitre IV</i>

Mobilisation des précurseurs hématopoïétiques, mésenchymateux et endothéliaux par du G-CSF et conséquences sur la réparation tissulaire cardiaque après infarctus chez la souris.

4.1. Objectifs du travail et méthodes

Les maladies cardiaques constituent la cause prédominante d'invalidité et de mortalité dans les nations industrialisées et, de façon plus particulière, les arrêts cardiaques surviennent majoritairement suite à une lésion ischémique. La guérison de ces pathologies cardiaques exige le remplacement des myocytes endommagés et l'amélioration de l'apport sanguin. Plusieurs rapports précédents ont décrit une augmentation des cellules progénitrices endothéliales dans le SP de patients présentant un infarctus aigu du myocarde^{141,142,256}. Cependant, à notre connaissance, peu de données sont disponibles concernant l'évolution des CPH et CPM dans des circonstances identiques. C'est pourquoi nous avons évalué si l'induction d'un IM chez la souris pouvait affecter le nombre de progéniteurs dans le SP et la MO. En effet, il serait intéressant que ces cellules puissent être détectées en tant que biomarqueurs des pathologies cardiaques.

Mais plus encore, des expériences sur des animaux, ainsi que des études cliniques, ont suggéré que les CS de la MO pouvaient contribuer à la réparation cardiaque, en améliorant la perfusion et la fonction du myocarde à la suite d'une insuffisance vasculaire. Afin d'augmenter le nombre de ces cellules, une option envisageable serait de mobiliser des CS de la MO dans le SP, avec l'espoir que ces cellules s'implantent dans le myocarde endommagé et contribuent à sa « réparation ». C'est pourquoi nous avons plus particulièrement étudié le G-CSF pour ses capacités communément acceptées à mobiliser les CSH dans le SP, mais également les CPM et CPE comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent. Pour ce faire, nous avons comparé deux timings de mobilisation : administration journalière du G-CSF, soit pendant 5 jours après l'infarctus, soit pendant 5 jours avant et 5 jours après la chirurgie.

D'autre part, au-delà de son potentiel à mobiliser les CS, le G-CSF semble posséder des effets cardioprotecteurs directs, comme par exemple une action anti-apoptotique sur les cardiomyocytes, une amélioration de la résorption du tissu nécrotique, ou encore une induction de l'angiogenèse. En effet, le G-CSF est une cytokine puissante qui pourrait être

employée comme nouvelle stratégie thérapeutique pour l'IM aigu. C'est pourquoi, l'objectif de cette 4^{ème} partie est d'étudier plus précisément la contribution du G-CSF à la réparation du tissu cardiaque dans notre modèle murin de ligature de l'artère coronaire. L'impact de deux timings de traitement par G-CSF, sur la survie, la fonction hémodynamique cardiaque et la perfusion a été étudié par l'usage complémentaire de l'échographie Doppler, l'imagerie strain 2-dimension non Doppler, l'évaluation hémodynamique à partir de boucles pression-volume et l'imagerie μ SPECT. Nous avons ainsi déterminé, une semaine après l'induction de l'IM, les conséquences d'un traitement par du G-CSF sur les modifications fonctionnelles et structurelles induites par l'infarctus.

Nous avons enfin réalisé une étude préliminaire de l'effet, dans notre modèle murin d'IM, du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et d'une molécule de VEGF qui a été déléetée de son exon 5, la rendant résistante à la protéolyse induite par la plasmine. En effet, les membres de la famille du VEGF sont parmi les modulateurs les plus puissants de la biologie vasculaire. Ils régulent la vasculogénèse, l'angiogénèse, et le maintien des vaisseaux sanguins pendant l'embryogénèse, mais aussi chez l'adulte. En raison de ses effets importants sur le réseau vasculaire, le VEGF a suscité l'intérêt quant à son utilisation thérapeutique potentielle dans la médecine cardio-vasculaire, particulièrement pour la croissance vasculaire thérapeutique lors de l'ischémie myocardique et des membres périphériques.

4.2. Résultats

Tout au long de ce chapitre, nous allons comparer 5 groupes d'animaux :

1. Souris « sham-operated » ou « sham » ou encore **SO** : animaux ayant subi l'entièreté de l'opération, à l'exception de la ligature
2. Souris « sham-operated » injectées pendant 5 jours avec du G-CSF ou **SO-G-CSF x 5J**
3. Souris ligaturées injectées avec un tampon salin ou **IM-salin**
4. Souris ligaturées injectées pendant 5 jours avec du G-CSF ou **IM-G-CSF x 5J**
5. Souris ligaturées injectées pendant 5 jours avant l'IM et 5 jours après avec du G-CSF ou **IM-G-CSF x 10J**

4.2.1. G-CSF et cellules progénitrices

4.2.1.1. Paramètres médullaires et sanguins

Les paramètres sanguins et médullaires ont été évalués lors du sacrifice des animaux, 7 jours après l'induction de l'IM, c'est à dire 48H après l'administration de la dernière dose de G-CSF aux souris traitées. L'hématocrite et le nombre de plaquettes ne sont pas différents entre les groupes étudiés (Fig. 51). Les globules blancs médullaires sont diminués après l'induction de l'IM ($p < 0.05$) et cette diminution est amplifiée après traitement par du G-CSF ($p < 0.001$). Le nombre de globules blancs dans le SP augmente après l'ischémie ($p < 0.05$), alors que l'effet de G-CSF sur les globules blancs n'est plus discernable deux jours après l'arrêt du traitement.

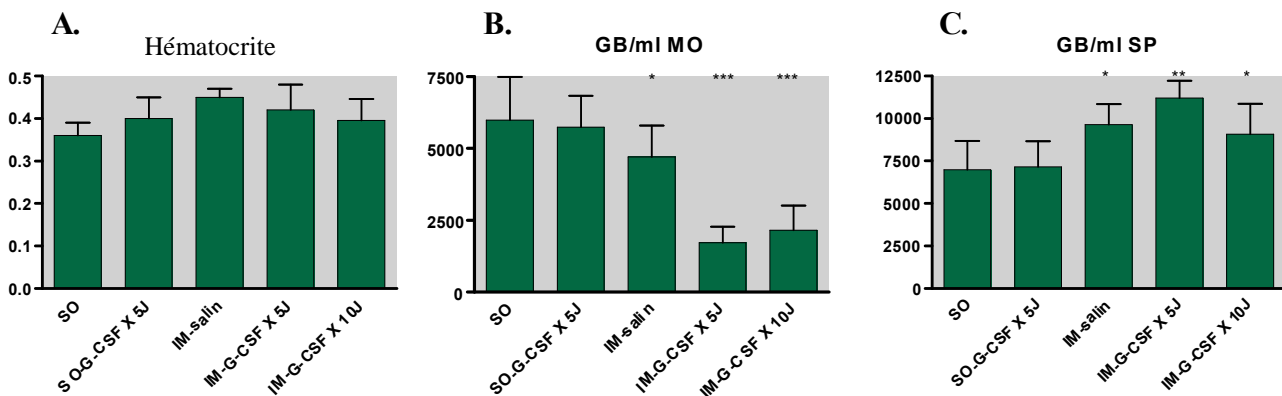


Figure 51: Evolution de l'hématocrite **A.** et du nombre de globules blancs dans la MO **B.** et dans le SP **C.** dans les 5 groupes d'animaux: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris « sham-operated ».

4.2.1.2. Analyse en FACS des précurseurs mobilisés

Les souris souffrant d'IM ont moins de CPH de phénotype $CD45^+Kit^+Sca^+$ dans la MO que les souris «sham operated» ($p < 0.001$) (Fig.52). Deux jours après l'arrêt du G-CSF, le nombre de CPH de la MO est augmenté chez les souris ligaturées ($p < 0.01$), alors qu'il est diminué chez les souris «sham operated» ($p < 0.05$). Les CPH ne sont mobilisées dans le SP qu'à la suite du traitement par du G-CSF ($p < 0.001$) et non pas après l'induction de l'infarctus sans injection du facteur de croissance. Cependant, cette mobilisation des CPH est plus importante chez les souris souffrant d'IM et recevant du G-CSF, que chez les souris saines recevant un traitement identique ($p < 0.001$).

Après l'induction de l'IM, le nombre de CPM de phénotype $CD45^-106^+11b^-$ et de PE $CD45^-34^+31^+$ de la MO a diminué légèrement (NS), tandis que les CPM et les PE sont

respectivement 10 fois ($p < 0.001$) et 8 fois ($p < 0.001$) plus nombreuses dans le SP (Fig. 51). Le G-CSF induit une augmentation significative des CPM ($p < 0.01$) et des PE ($p < 0.01$) dans la MO et mobilise également les deux types de cellules progénitrices dans le SP des souris «sham-operated» ($p < 0.05$), et des souris souffrant d'IM ($p < 0.001$).

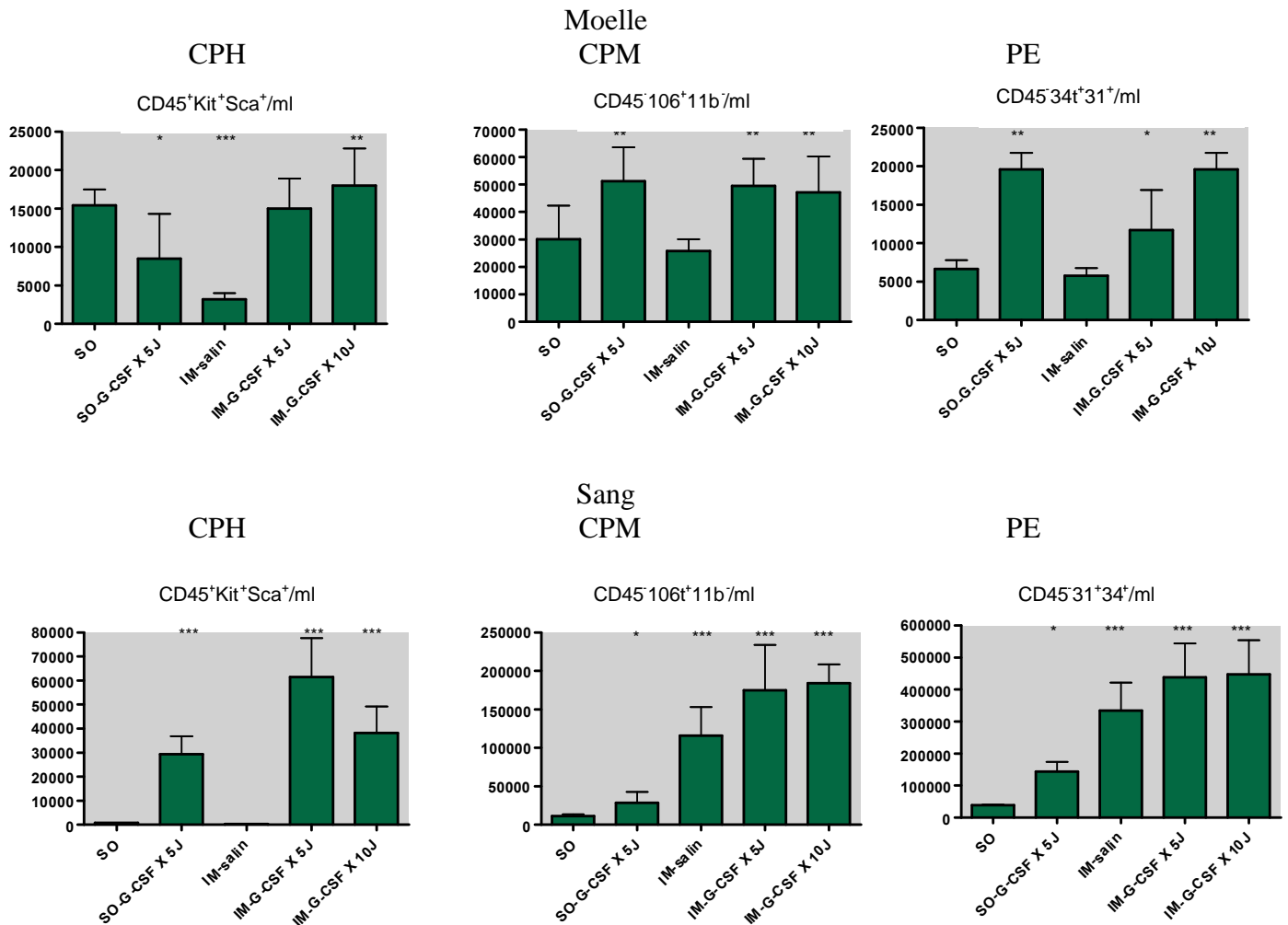


Figure 52: Evolution du nombre de CPH, CPM et PE dans la MO et dans le SP dans les 5 groupes d'animaux: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris «sham-operated».

4.2.1.3. Evaluation du potentiel clonogénique des cellules progénitrices

Nous pouvons observer que le nombre de CFU-GM n'est pas modifié dans la MO après induction de l'IM mais qu'il diminue dans le SP ($p < 0.001$). Deux jours après l'arrêt du G-CSF, il y a une diminution significative du nombre de CFU-GM formées à partir des cellules médullaires chez les souris ligaturées ($p < 0.001$), mais pas chez les souris «sham-operated». D'autre part, nous dénombrons un nombre plus élevé de CFU-GM obtenues à partir des cellules sanguines chez les animaux «sham-operated» recevant le facteur de croissance ($p < 0.001$) et, de façon encore plus importante, chez les souris ligaturées ($p < 0.001$).

La capacité clonogénique des CPH dans le SP est donc identique chez les souris souffrant d'infarctus ou non et injectées durant 5J par du G-CSF ; toutefois, elle est plus importante chez les animaux ligaturés traités pendant 10J ($p < 0.001$).

Après la survenue de l'IM, le nombre de CFU-F de la MO diminue considérablement ($p < 0.001$), alors qu'il augmente significativement dans le SP ($p < 0.001$) (Fig. 53). Les injections de G-CSF réduisent fortement le nombre de CFU-F formées à partir des cellules médullaires ($p < 0.001$) et augmentent les CFU-F dénombrées dans le SP, de façon beaucoup plus importante chez les souris ligaturées ($p < 0.001$) que chez les souris «sham-operated animals» ($p < 0,05$).

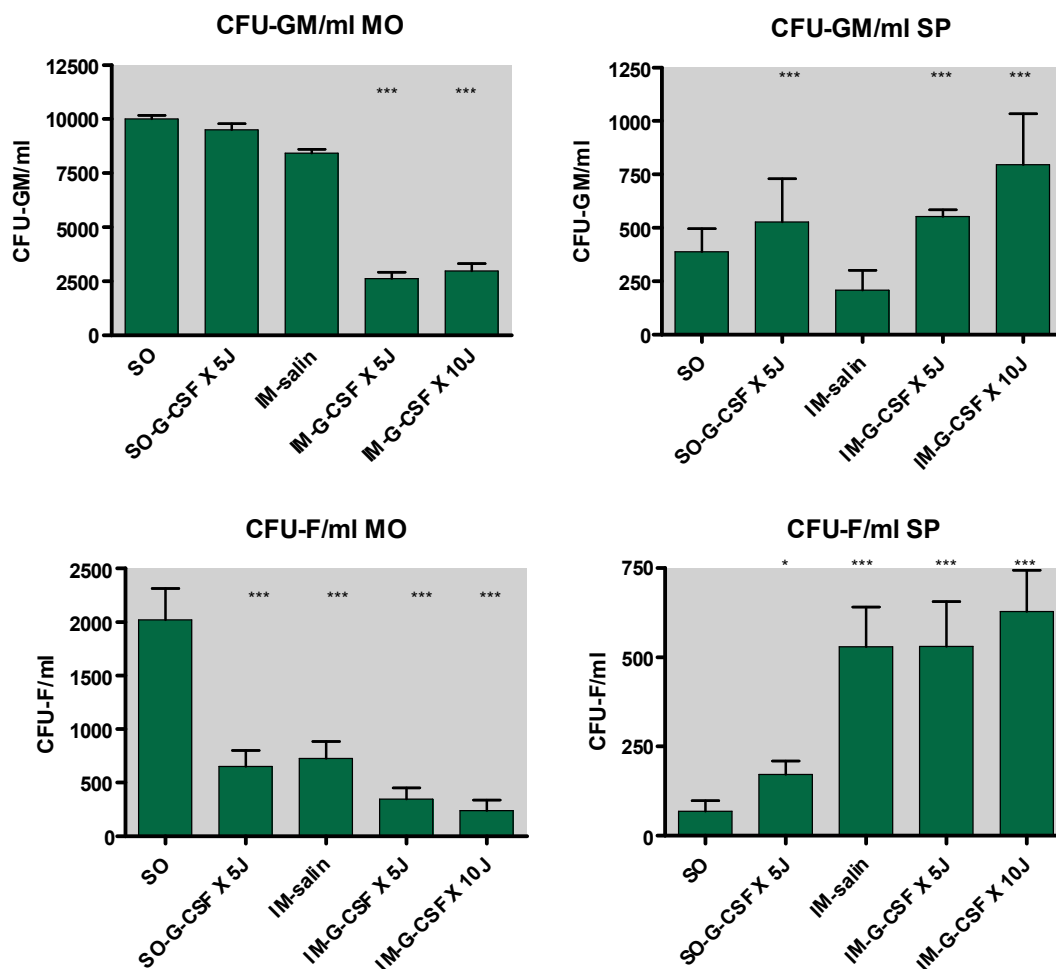


Figure 53: Evolution du nombre de CFU-GM et CFU-F dans la MO et dans le SP chez les 5 groupes d'animaux: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris «sham-operated».

4.2.1.4. Dosages plasmatiques

La troponine T a été mesurée le 7ème jour après l'induction de l'infarctus ou la «shame opération», soit 48 heures après la dernière dose de G-CSF chez des souris recevant le G-CSF. La concentration plasmatique en troponine T augmente significativement après

l'induction de l'IM ($p < 0,001$), alors qu'elle ne varie pas chez les souris «sham-operated animals». L'injection de G-CSF diminue significativement les concentrations de troponine T après 5 jours ($p < 0,01$), et plus encore après 10 jours ($p < 0,001$) de traitement (Fig. 54 A.). L'injection de G-CSF chez les animaux sains réduit les niveaux plasmatiques du SDF-1 ($p < 0,05$). Nous avons observé une augmentation significative du SDF-1 et du G-CSF après ligature de l'artère coronaire ($p < 0,05$). Chez les souris traitées avec le G-CSF pendant 5 jours, l'augmentation du SDF-1 et G-CSF est fortement limitée ($p < 0,05$) et même réduite en-dessous des valeurs pour le SDF-1 chez les souris «sham-operated animals». Chez celles traitées avec le G-CSF pendant 10 jours, la réponse était similaire ($p < 0,05$), si ce n'est que le G-CSF n'a pas augmenté du tout (Fig. 54 A. et B.).

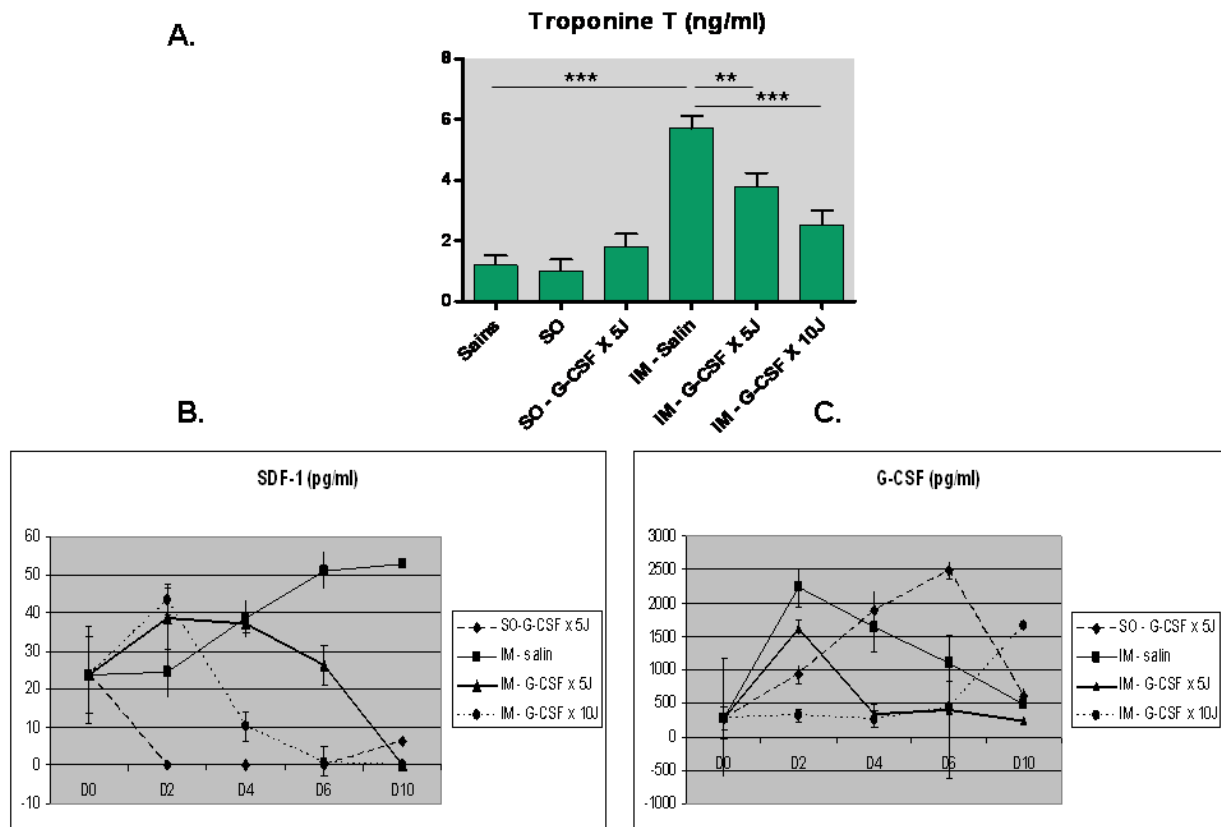


Figure 54: Concentration plasmatique en troponine T (A.), SDF-1 (B.) et G-CSF (C.) dans les 6 groupes d'animaux (1. Souris saines, 2. Souris «sham-operated», 3. Souris «sham-operated» injectées pendant 5 jours avec du G-CSF ou SO-G-CSF x 5J, 4. Souris ligaturées injectées avec un tampon salin, 5. Souris ligaturées injectées pendant 5 jours avec du G-CSF, 6. Souris ligaturées injectées pendant 5 jours avant l'IM et 5 jours après avec du G-CSF). La troponine T a été mesurée le 7ème jour après l'induction de l'infarctus ou la «shame opération», soit 48 heures après la dernière dose de G-CSF chez des souris recevant le G-CSF ($n = 12$ dans chaque groupe). Le SDF-1 et le G-CSF ont été mesurés dans 4 groupes d'animaux (1. Souris «sham-operated» injectées pendant 5 jours avec du G-CSF ou SO-G-CSF x 5J, 2. Souris ligaturées injectées avec un tampon salin, 3. Souris ligaturées injectées pendant 5 jours avec du G-CSF, 4. Souris ligaturées injectées pendant 5 jours avant l'IM et 5 jours après avec du G-CSF) à 2, 4, 6 et 10 jours après la ligature des artères coronaires ou après le début du traitement indiqué ($n = 3$ dans chaque groupe): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.2.2. Effets du G-CSF sur la perfusion et la fonction myocardique après infarctus

4.2.2.1. Survie

Nous obtenons un taux de mortalité de 7% lié à l'intervention de ligature de l'artère coronaire gauche, et ce dans les 3 heures suivant la chirurgie. Ces animaux sont exclus de l'étude statistique. Parmi les souris ligaturées restantes, la survie augmente de 70% chez les animaux recevant un tampon salin, à 83% ($p < 0.05$) chez les souris recevant 5 jours de G-CSF après l'IM, et à 100% ($p < 0.01$) chez celles recevant du G-CSF 5 jours avant et 5 jours après l'induction de l'infarctus (Fig. 55). L'ensemble des décès survient dans les 3 à 7 jours après l'IM. Il n'y a aucune mortalité chez les souris «sham-operated».

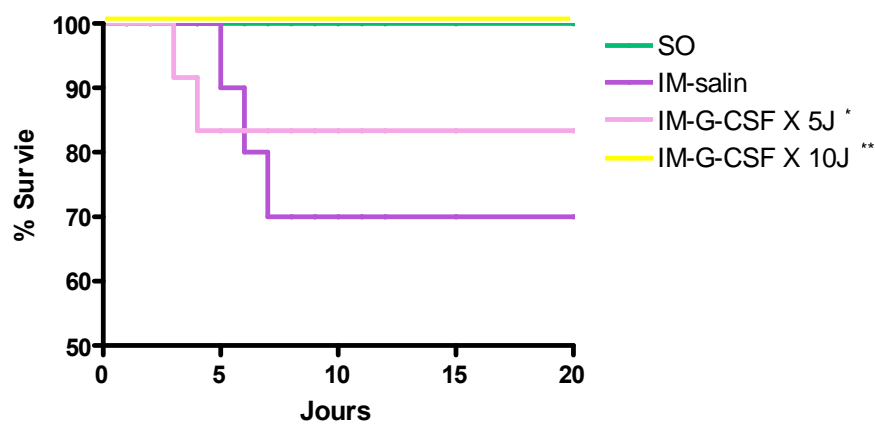


Figure 55: Survie des 4 groupes d'animaux SO, IM-salin, IM-G-CSF x 5J et IM-G-CSF x 10J (N= 24 dans chaque groupe): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris «sham-operated».

4.2.2.2. Poids du cœur

Nous avons constaté que le rapport poids du cœur sur poids total de la souris est significativement plus élevé chez les animaux souffrant d'IM que chez les souris «sham-operated» ($p < 0.01$). Le traitement par du G-CSF n'a pas d'impact sur ce rapport de poids chez les animaux non ligaturés, tandis qu'il permet de ramener le poids du cœur de animaux souffrant d'IM aux valeurs normales rencontrées chez les souris saines (Fig. 56).

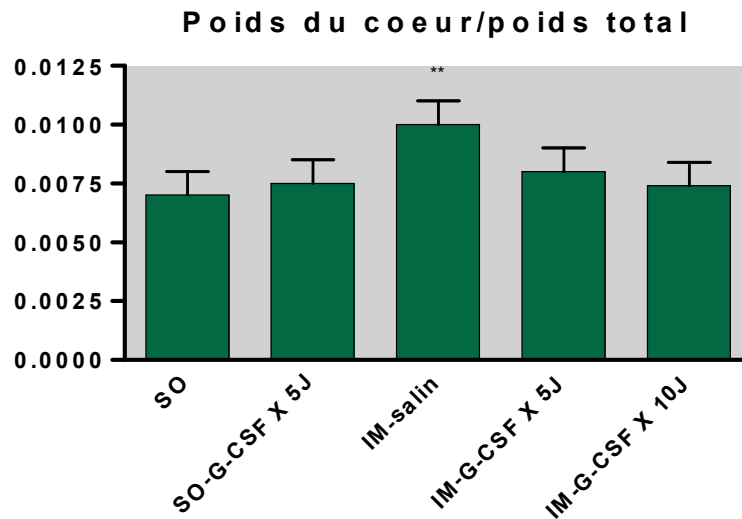


Figure 56: Evolution du poids du cœur dans les 5 groupes d'animaux: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris «sham-operated».

4.2.2.3. Histologie et taille de l'infarctus

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre II, les analyses histologiques et les colorations à l'hématoxyline-éosine montrent que la zone d'infarctus comprend une portion importante des parois antérieures et latérales, l'entièreté de la zone apicale et est parfois étendue aux territoires moyen et apical de la paroi inférieure. Le septum est généralement épargné. L'amincissement de la paroi du VG, la dilatation de cette cavité, ainsi que l'hypertrophie réactionnelle des régions du myocarde non atteintes par l'ischémie, sont améliorés chez les souris traitées par du G-CSF. L'infiltration de globules blancs est plus faible après 10 jours de traitement par du G-CSF (mais non après 5 jours de traitement) que chez les animaux ayant reçu le tampon salin (Fig 57 A.).

La taille de la zone de fibrose déterminée par une coloration au TTC diminue de 52.3 ± 12.1 % chez les animaux non traités, à 47.8 ± 3.6 % (NS) chez les souris traitées avec G-CSF pendant 5 jours, et à 35.5 ± 7.3 % ($p < 0.01$) chez celles ayant reçu 10 jours de G-CSF (Fig 57 B.). Ce paramètre est statistiquement inférieur chez les animaux traités pendant 10 jours, comparé à celui des animaux ne recevant que 5 jours de G-CSF ($p < 0.001$). L'évaluation des dépôts de collagène par la coloration au trichrome montre des résultats similaires ; toutefois, la taille de l'infarctus est systématiquement plus petite, approximativement de 5% par rapport à celle obtenue après coloration au TTC.

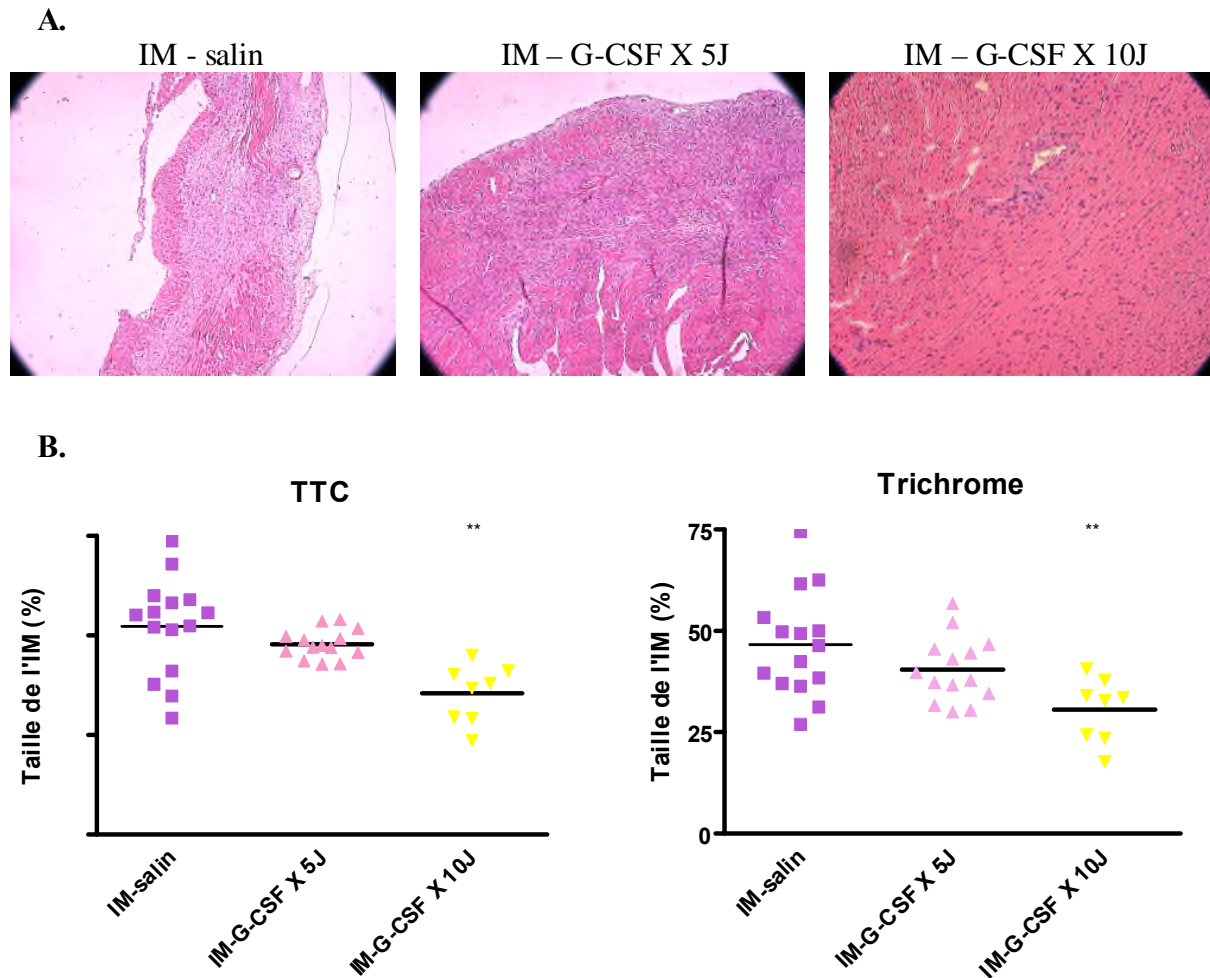
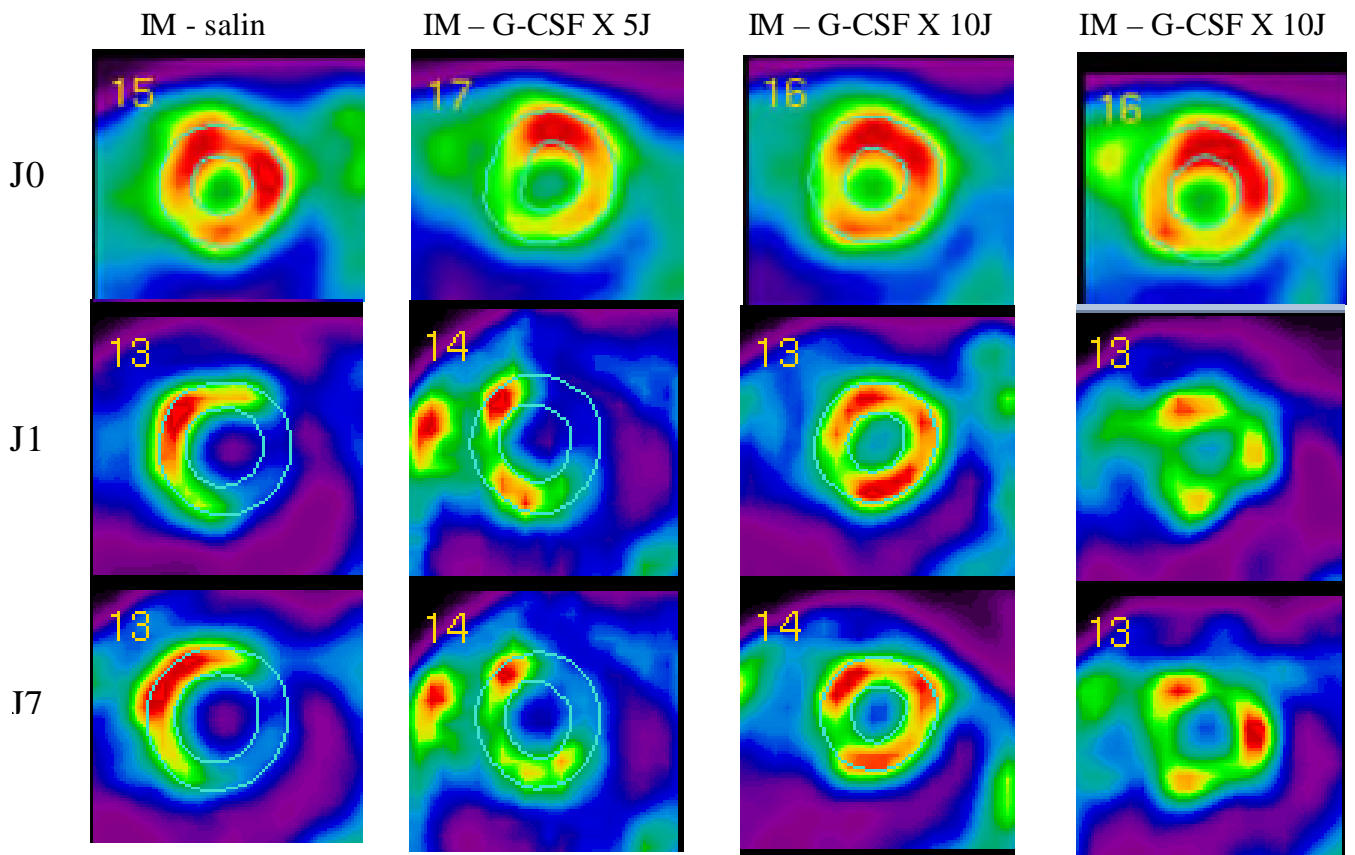
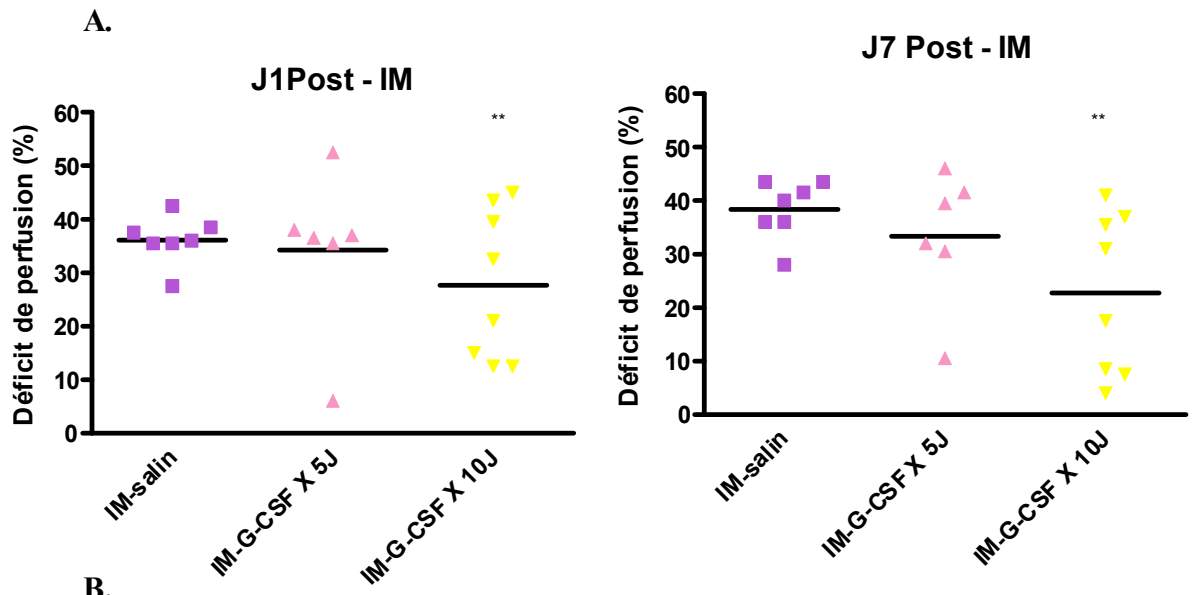


Figure 57: Détermination de la taille de l'infarctus chez des souris ligaturées injectées avec un tampon salin ou du G-CSF pendant 5 ou 10 jours. **A.** Coloration à l'hématoxyline éosine montrant un infiltrat de globules blancs. **B.** après coloration au TTC ou au trichrome: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris «sham-operated».

4.2.2.4. Perfusion cardiaque : analyses immunohistochimiques et par μ SPECT

Le lendemain de l'induction de l'IM, nous pouvons déjà observer que le déficit de perfusion est plus faible chez les animaux traités avant et après la ligature par du G-CSF ($p < 0.01$), mais pas chez ceux qui reçoivent 5 jours de G-CSF après l'IM. Au jour 7, ce déficit de la perfusion du muscle cardiaque s'accroît (NS) chez les animaux injectés avec du tampon salin, reste stable chez ceux recevant 5 jours de G-CSF en post-opératoire, et diminue chez ceux ayant reçu du G-CSF pendant 5 jours avant et pendant 5 jours après l'IM ($p < 0.01$) (Fig. 58 A.). Dans ce dernier groupe, nous avons observé deux types d'images : soit une amélioration homogène de perfusion, soit plusieurs « spots » présentant une fixation plus importante du radio-isotope (Fig. 58 B.). On a également observé le deuxième type d'images chez les animaux qui ont reçu 5 jours de G-CSF.

L'analyse immunohistologique confirme que, dans la périphérie de la cicatrice du myocarde, le nombre d'artéριοles CD31-positives est plus élevé chez les souris traitées pendant 5 jours (NS), et plus encore chez celles recevant 10 jours de traitement au G-CSF ($p < 0.05$), que chez les souris «sham-operated» (2.36 ± 0.76 vs 2.52 ± 0.64 vs 1.89 ± 0.71 respectivement) (Fig. 58 C.).



C.

IM - salin

IM – G-CSF X 5J

IM – G-CSF X 10J

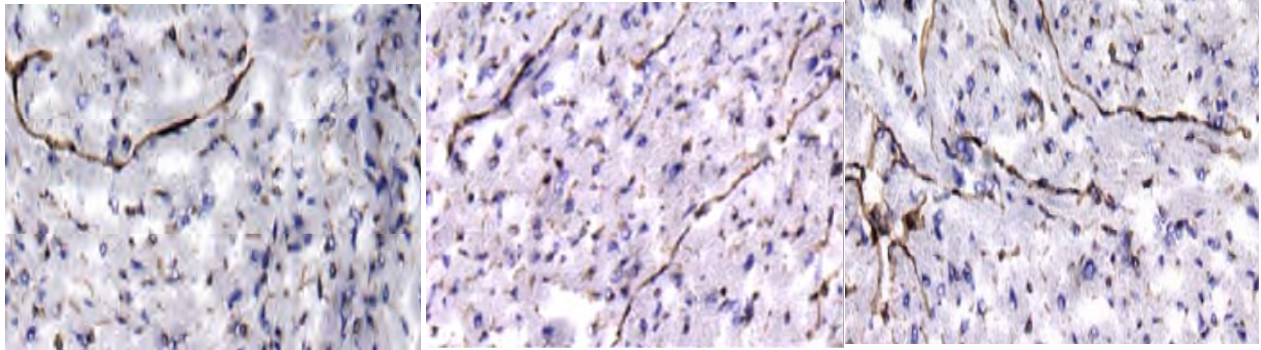


Figure 58: A. Déficit de la perfusion, obtenu par μ SPECT chez des souris ligaturées injectées avec un tampon salin ou recevant pendant 5 ou 10 jours du G-CSF : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec le groupe de souris «sham-operated». . B. Exemples d'images obtenues en μ Spect dans ces 3 groupes de souris (la couleur rouge indique la perfusion la plus élevée, la bleue la plus basse perfusion). C. Analyses immunohistochimiques des artérioles CD31-positives en périphérie de l'IM chez les mêmes animaux (Amplification 50X).

4.2.2.5. Fonction myocardique

4.2.2.5.1. Echocardiographie

Les dimensions et la fonction du VG ont été évaluées en échocardiographie les jours 1 (Tableau 10) et 7 (Tableau 11), après l'induction de l'IM ou la «sham operation». La fréquence cardiaque est comparable dans les 4 groupes d'animaux.

Le lendemain de la survenue de l'IM, les dimensions internes du VG en fin de diastole (DIVGd) et de systole (DIVGs) sont augmentées par rapport aux souris «sham operated» et le traitement par G-CSF ne semble pas améliorer ces paramètres. Au jour 7, le DIVGd reste significativement plus élevé uniquement chez les animaux ayant reçu 10 jours de G-CSF, même si, chez les souris injectées avec du tampon salin ou ayant reçu 5 jours de G-CSF, cette dimension reste supérieure à la normale. Le DIVGs, quant à lui, est presque totalement normalisé suite au traitement par G-CSF. L'épaisseur de la paroi du VG (EPVG) est inférieure après l'IM ($p < 0.001$) mais est corrigée, aussi bien au J1 qu'au J7, chez les souris recevant du G-CSF avant la ligature ($p < 0.05$). L'épaisseur du septum interventriculaire en systole est également diminuée aux J1 et J7 dans les cœurs infarcis et n'est pas modifiée par un traitement par du G-CSF. La fraction d'éjection du VG (FEVG) ($p < 0.001$) et le débit cardiaque (DC) (NS) sont diminués le lendemain de l'induction de l'IM, aussi bien chez les animaux non traités que traités. Au J7, la FEVG reste diminuée dans les 3 groupes de souris, alors que le DC, toujours inférieur à la normale chez les souris recevant le tampon salin, augmente au-delà des valeurs normales chez les animaux recevant le G-CSF.

La déformation mesurée par Doppler tissulaire ou strain est fortement diminuée dans le secteur du VG ischémié et montre une amélioration partielle au J1, mais pas au J7, chez les animaux recevant 10 jours de G-CSF. Le strain augmente dans la paroi postérieure saine après IM (NS) et n'est pas modifié par le traitement.

Tableau 10: Paramètres échocardiographiques obtenus le lendemain de l'induction de l'IM ou de l'opération «sham».

Jour 1 post-IM	SO	IM - salin †	IM - G-CSF x 5 J ‡	IM - G-CSF x 10 J ‡
FC (bpm)	254 ± 73	262 ± 45	257 ± 30	258 ± 43
DIVGd (mm)	3.8 ± 0.5	4.5 ± 0.2 ***	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.8
DIVGs (mm)	2.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3 ***	3.3 ± 0.5	3.6 ± 0.9
EPVG (mm)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1 ***	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2 *
ESIs (mm)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2 *	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
FEVG (%)	65.2 ± 2.6	44.9 ± 6.0 ***	44.1 ± 14.1	42.2 ± 9.6
DC (µl/sec)	213 ± 99	143 ± 128	153 ± 29	160 ± 79
Strain IM (%)	33.0 ± 5.8	7.8 ± 3.9 ***	14.5 ± 20.7	16.0 ± 11.5 *
Strain pp (%)	29.0 ± 10.3	37.1 ± 16.8	39.0 ± 20.6	36.1 ± 14.5

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; DIVGd = dimensions internes du VG en fin de diastole ; DIVGs = dimensions internes du VG en fin de systole; EPVG = épaisseur de la paroi postérieure du VG ; ESIs = épaisseur du septum interventriculaire en systole; FEVG = fraction d'éjection du ventricule gauche; DC = débit cardiaque; strain IM = strain dans la zone de l'infarctus du myocarde ; strain pp = strain dans la paroi postérieure du ventricule gauche.

Les valeurs de p sont données en comparaison avec les données des souris « sham-operated »[†] ou les souris ligaturées injectées avec un tampon salin[‡]: *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001.

Tableau 11: Paramètres échocardiographiques obtenus au J7 après l'opération chez les «sham operated animals» et chez les souris ligaturées traitées ou non par du G-CSF.

Jour 7 post-IM	SO	IM - salin †	IM - G-CSF x 5 J ‡	IM - G-CSF x 10 J ‡
FC (bpm)	266 ± 82	262 ± 64	256 ± 39	261 ± 47
DIVGd (mm)	3.8 ± 0.5	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.6	4.5 ± 0.4 *
DIVGs (mm)	3.1 ± 0.3	3.8 ± 0.2 ***	3.3 ± 0.7 *	3.4 ± 0.5 *
EPVG (mm)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1 †
ESIs (mm)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2 †	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2
FEVG (%)	61.9 ± 4.1	45.8 ± 12.6 ***	40.3 ± 10.9	46.7 ± 7.4
DC (µl/sec)	200 ± 77	162 ± 63	261 ± 65 **	228 ± 99
Strain IM (%)	37.0 ± 6.1	6.4 ± 4.0 ***	7.2 ± 11.2	7.5 ± 8.2
Strain pp (%)	30.0 ± 8.3	36.1 ± 5.1	38.4 ± 12.8	38.6 ± 9.7

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; DIVGd = dimensions internes du VG en fin de diastole ; DIVGs = dimensions internes du VG en fin de systole; EPVG = épaisseur de la paroi postérieure du VG ; ESIs = épaisseur du septum interventriculaire en systole; FEVG = fraction d'éjection du ventricule gauche; DC = débit cardiaque; strain IM = strain dans la zone de l'infarctus du myocarde ; strain pp = strain dans la paroi postérieure du ventricule gauche.

Les valeurs de p sont données en comparaison avec les données des souris « sham-operated » † ou des souris ligaturées injectées avec un tampon salin ‡: * p<0.05, † p<0.01, *** p<0.001.

4.2.2.5.2. Boucles pression - volume

Les données hémodynamiques sont acquises le J8 suivant l'induction de l'IM ou l'opération «sham», aux conditions basales, ainsi qu'après réduction de la précharge (Tableau 12). Chez les animaux ligaturés, la pression de fin de systole (PFS) est inférieure à celle des souris «sham-operated», alors que la valeur diastolique correspondante (PFD) n'est pas altérée. Le volume du VG en fin de systole (VFS) est augmenté après l'induction de l'infarctus. Le travail du myocarde (TM) est diminué alors que la constante de relaxation temps-dépendante Tau-W et l'élastance (Ees) ne sont pas modifiées suite à l'ischémie. Le traitement par G-CSF corrige les valeurs de PFS, alors qu'il induit une augmentation de la PFD et du VFD (NS) au-delà des valeurs normales. Le travail myocardique reste inférieur à celui des souris «sham-operated», bien qu'il soit partiellement corrigé chez les souris recevant 10 jours de G-CSF. Ees reste stable et constante dans tous les groupes alors que Tau-W augmente bien au-delà des valeurs basales après l'administration du G-CSF.

Tableau 12: Evaluation de la fonction du ventricule gauche, 8 jours après l'opération chez les souris «sham-operated» et chez les souris ligaturées traitées ou non par du G-CSF, par des mesures de pression-volume dans les conditions basales où après réduction de la précharge.

Jour 8 post IM	SO	IM - salin †	IM - G-CSF x 5 J ‡	IM - G-CSF x 10 J ‡
FC (bpm)	256 ± 82	263 ± 64	256 ± 39	261 ± 47
PFS (mm Hg)	88.2 ± 17.3	66.9 ± 10.4 **	79.5 ± 9.6 **	93.6 ± 19.6 ***
PFD (mm Hg)	9.6 ± 5.8	10.4 ± 5.9	29.1 ± 9.5 ***	40.3 ± 13.3 ***
VFS (µL)	58.9 ± 21.4	91.99 ± 25.6 **	88.4 ± 31.4	82.4 ± 28.8
TM (µL)	1929 ± 245	1015 ± 463 **	794 ± 349	1232 ± 296 *
Tau-w (msec)	13.0 ± 2.5	14.1 ± 5.3	29.3 ± 12.4 ***	24.8 ± 6.1 ***
Ees (mmHg/ml)	2.65 ± 0.94	2.13 ± 1.27	2.47 ± 1.84	2.81 ± 2.02

FC = fréquence cardiaque ; bpm = battements par minute; PFS = pression de fin de systole, PFD = pression de fin de diastole, VFS = volume de fin de systole, TM travail myocardique, Tau-w = constance de relaxation mesurée par la méthode « Tau-Logistic », Ees = élastance.

Les valeurs de p sont données en comparaison avec les données des souris « sham-operated »[†] ou les souris ligaturées injectées avec un tampon salin[‡] : p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

4.2.3. Effets du VEGF sur le muscle cardiaque après IM

Les expériences préliminaires, dont les résultats sont exposés ci-dessous, ont été réalisées avec un effectif de 6 souris contrôles, 5 souris traitées par du VEGF standard et 6 souris recevant du VEGF résistant à la protéolyse par la plasmine.

4.2.3.1. Survie

Nous avons observé une amélioration significative de la survie des animaux souffrant d'IM après un traitement par du VEGF. En effet, aussi bien pour le VEGF classique que pour celui rendu résistant à la protéolyse, nous n'observons plus aucun décès après le traitement (Fig. 59).

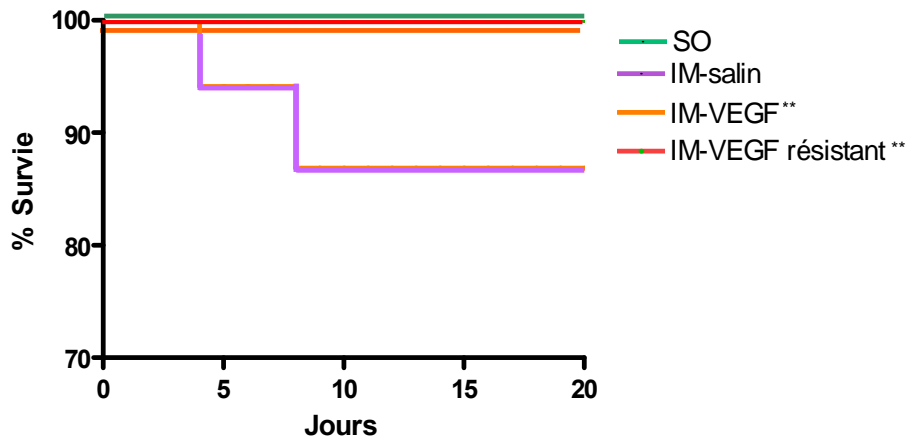


Figure 59: Survie des souris «sham-operated» et des souris ligaturées injectées avec un tampon salin ou recevant pendant 5 jours du VEGF ou du VEGF résistant à la protéolyse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec les souris «sham-operated».

4.2.3.2. Poids du cœur

Le poids du cœur, ainsi que le rapport poids du cœur sur poids corporel total, est significativement inférieur chez les animaux ligaturés traités par du VEGF résistant ou non à la protéolyse, par rapport à ceux recevant un tampon salin (Fig.60).

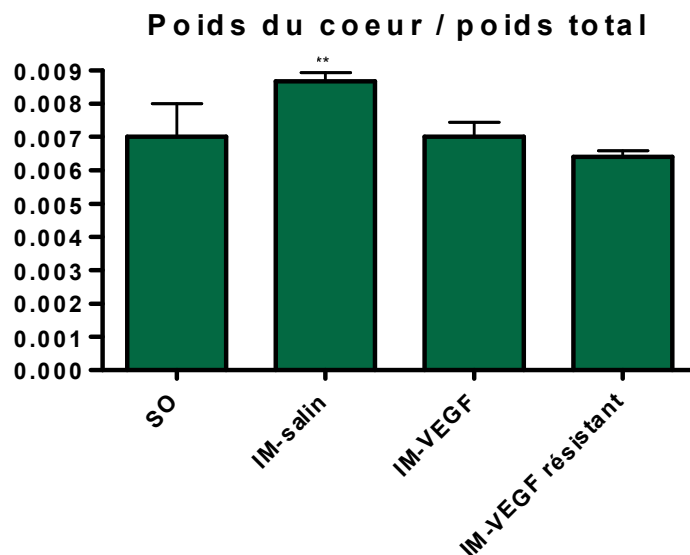


Figure 60: Evolution du poids du cœur des souris «sham-operated» et des souris ligaturées injectées avec un tampon salin ou recevant pendant 5 jours du VEGF ou du VEGF résistant à la protéolyse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pour les comparaisons avec les souris «sham-operated».

4.2.3.3. Taille de l'infarctus

Après coloration au TTC ou au trichrome, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative de la taille de l'infarctus chez les animaux ligaturés, traités par du VEGF résistant ou non à la protéolyse, par rapport à ceux recevant un tampon salin. Cette diminution de la zone nécrosée est plus importante chez les animaux ayant reçu du VEGF résistant à la protéolyse (Fig.61).

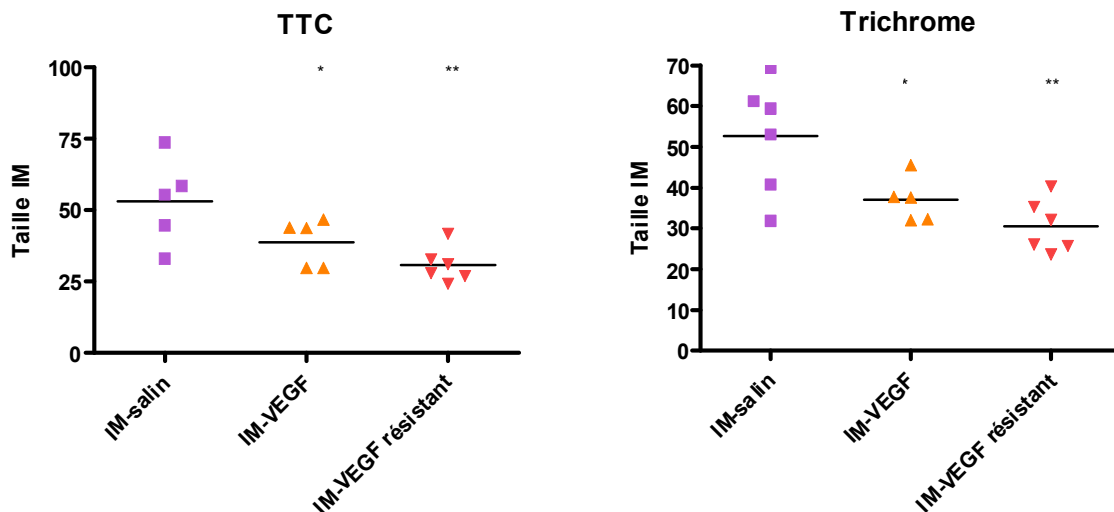


Figure 61: Détermination de la taille de l'infarctus chez des souris «sham-operated» et des souris ligaturées injectées avec un tampon salin ou recevant pendant 5 jours du VEGF ou du VEGF résistant à la protéolyse. * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001 pour les comparaisons avec les souris «sham-operated».

4.3. Discussion

Dans la première partie de ce dernier chapitre, nous avons tout d'abord examiné l'impact de la survenue d'un IM sur les paramètres hématologiques. Massa et al. ont démontré qu'à l'admission, le nombre de globules blancs est sensiblement plus élevé chez les patients présentant un IM aigu¹³⁵. Nous avons également observé que le nombre de globules blancs augmente dans le SP après l'apparition de l'ischémie, mais aussi qu'il diminue dans la MO ; ces variations peuvent trouver une explication dans le processus inflammatoire se déroulant dans le muscle cardiaque sous la forme d'une infiltration par les cellules inflammatoires. Massa et al. ont également observé un nombre accru de CPH dans la phase précoce de la maladie¹³⁵ et Wojakowski et al. ont constaté que le nombre de cellules doublement positives CD34/CXCR4 et CD34/CD117 augmente chez les patients présentant un IM avec élévation du segment ST (STEMI), comparé aux sujets sains²⁵⁷. Brehm et al. ont rapporté une augmentation de la mobilisation des cellules CD34⁺-CD117⁺ et CD34⁺-KDR⁺ chez les

patients avec un STEMI, en comparaison avec ceux présentant une pathologie de l'artère coronaire. De plus, chez les patients qui présentent un STEMI, l'expression des molécules d'adhésion cellulaire est plus élevée, ce qui peut faciliter la transmigration et l'implantation des cellules progénitrices dans le muscle ischémié et ainsi faciliter la réparation myocardiale²⁵⁸. Cependant, dans notre étude, le nombre de CPH et de CFU-GM diminue aussi bien dans le MO que dans le SP, probablement en conséquence de l'inhibition post-inflammatoire de l'hématopoïèse. Ces discordances peuvent trouver une explication dans les différences de timing des analyses par rapport à la survenue de l'IM, mais également dans le fait que l'on observe deux espèces différentes (l'homme et la souris). Plusieurs rapports ont pu démontrer une augmentation de CPE circulantes les jours qui suivent un syndrome coronaire aigu ou une intervention de chirurgie cardiaque^{135,142,259}. Des fluctuations spontanées du nombre de CSM dans le SP associées à l'évolution d'un STEMI ont également été décrites¹⁵⁰. Dans notre étude, les nombres de CPM et de PE de la MO ne varient pas, tandis que les CFU-F formées à partir des cellules médullaires diminuent ; ces 3 paramètres augmentent considérablement dans le SP, confirmant une mobilisation importante des cellules progénitrices, en réponse à l'inflammation myocardique. Ces résultats rassemblent pour la première fois une analyse simultanée des trois types de cellules progénitrices, aussi bien dans le SP que dans la MO. Il apparaît clairement que les cellules progénitrices augmentent spécifiquement suite à l'IM et non pas chez les souris « sham-operated », alors que ces dernières subissent l'entièreté de la chirurgie à l'exception de la ligature de l'artère coronaire.

Nous avons poursuivi par l'analyse de l'impact de l'administration de G-CSF sur la mobilisation de cellules progénitrices. La réduction du nombre de globules blancs dans la MO est amplifiée, suite au traitement par du G-CSF chez les animaux souffrant d'un IM, mais l'impact du G-CSF sur les globules blancs du SP n'était plus évident 48h après l'arrêt du traitement. Les CPH de la MO augmentent chez les souris ligaturées et traitées mais le nombre de CFU-GM diminue par rapport à celui des souris « sham-operated ». Les CPH (évaluées par analyse au FACS ou par dénombrement des CFU-GM) sont mobilisées dans le SP suite à l'administration du G-CSF, et ceci de façon beaucoup plus importante après l'induction de l'infarctus. Norol et al. ont également observé une augmentation de la mobilisation de cellules de CD34⁺ après l'administration de SCF et de G-CSF chez des babouins souffrant d'ischémie cardiaque, par rapport à des animaux non-mobilisés¹⁷⁰. L'administration de G-CSF induit une augmentation des cellules CD34⁺ CD117⁺ chez des patients présentant un IM aigu de taille importante¹⁸⁹, ou souffrant de maladie cardiaque ischémique chronique²⁶⁰. Le G-CSF influence également d'autres progéniteurs que les progéniteurs hématopoïétiques, comme le montre l'augmentation des CPM et CPE de la MO

et leur mobilisation importante en périphérie. Toutefois, les CFU-F ne suivent pas la même évolution et semblent être davantage influencées par l'ischémie cardiaque que par le facteur de croissance. D'autres publications ont également décrit une augmentation du nombre de CSM^{260,261} ou de PE^{174,260} circulantes suite à des injections de G-CSF, mais, à notre connaissance, aucune publication n'a évalué simultanément l'évolution des CPH, CPM (et de leur potentiel de clonogénique), et des PE dans le SP et dans la MO après traitement par du G-CSF dans le cadre d'un IM.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que l'administration de G-CSF est nécessaire pour mobiliser les CPH dans la circulation périphérique, alors que l'induction d'un IM est suffisante pour recruter les CPM et PE dans le SP, bien que ce phénomène soit significativement amplifié par un traitement par du G-CSF.

Afin d'évaluer l'impact de ce traitement par du G-CSF sur le muscle cardiaque ischémié, nous avons mesuré la troponine T cardiaque, marqueur cardio-spécifique très sensible des lésions myocardiques. La concentration de troponine T plasmatique augmente après un IM, mais diminue au bout de 5 ou 10 jours de traitement par du G-CSF.

Dai et al ont montré une augmentation des cellules c-kit⁺ après une ischémie du myocarde qui était positivement corrélée à une augmentation des concentrations sériques du G-CSF²⁶². Brehm et al ont également observé une augmentation de G-CSF chez des patients avec une modification du segment ST à l'ECG²⁵⁸. Nous avons donc évalué la concentration sérique en G-CSF, mais aussi en SDF-1, avant et après la ligature des coronaires. Nous avons constaté une augmentation significative de ces deux molécules après un IM, ce qui pourrait ainsi éventuellement faciliter la mobilisation des progéniteurs de la moelle. Cependant, l'injection de G-CSF semble limiter ces augmentations, à la fois chez les animaux sains et chez les souris ligaturées.

Nos expériences révèlent quelques résultats qui peuvent sembler contradictoires. Nous observons une bonne corrélation pour la détection de CPH et des CPM entre la cytométrie de flux et le dénombrement des CFU (CFU-GM et CFU-F, respectivement) dans le SP. Cependant, le nombre absolu de cellules détectées par analyse au FACS est supérieur à celui obtenu par l'analyse des CFU, indiquant que ces deux populations de cellules ne sont pas strictement identiques. De plus, dans la MO, les CPH et les CPM sont plus élevées suite au traitement par du G-CSF chez des animaux présentant un IM, mais le nombre de CFU-GM et CFU-F diminue par rapport aux colonies dénombrées chez des animaux ligaturés et traités avec un tampon salin. Il est envisageable que des facteurs inhibiteurs, présents dans la MO mais pas dans le SP, soient augmentés suite aux injections de G-CSF et puissent limiter la

formation des CFU. Ceci expliquerait la discordance observée entre le nombre de CPH et de CPM obtenu par phénotypage et celui découlant du dénombrement des CFU.

Nous reconnaissons que la corrélation entre le nombre de CFU-CPE et le nombre de cellules CD45-34+31+ fait défaut dans cette étude. Toutefois, ce n'est que très récemment que Pitchford²³⁰ a décrit des essais de CFU-CPE avec cellules murines. À notre connaissance, jusque là, tous les dosages CFU-CPE ont été réalisés uniquement avec des cellules humaines^{251,263}. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas effectué ces expériences. La capacité des CFU-CPE à former *in vitro* des structures tubulaires dans une matrice angiogénique serait également nécessaire afin de prouver formellement la fonctionnalité des CPE.

L'impact positif du G-CSF sur la réparation tissulaire cardiaque après un IM, observé chez l'animal^{162,167} et dans des études cliniques¹⁷⁹, peut être dû à la mobilisation de CS dans le SP et à leur migration dans le cœur, où elles pourraient se différencier en cardiomyocytes et/ou cellules endothéliales, ou encore sécréter localement des cytokines et facteurs de croissance agissant selon un mode paracrine. En effet, la mobilisation de CSM exprimant l'EGFP et transplantées directement dans la MO de souris léthalement irradiées montre que la majorité de cardiomyocytes nouvellement formés dérivent des CSM¹⁶⁷. Cependant, les CSM pourraient également se différencier en fibroblastes, une fois localisées dans un micro-environnement pro-fibroblastique²⁴⁸, et ceci pourrait induire une rigidification des parois du VG. Cependant, certaines publications affirment que les CSH ne se transdifférencient pas en cardiomyocytes à la suite d'un IM^{139,140}. D'autre part, ces cellules pourraient intervenir dans la réparation cardiaque de façon indirecte. Le G-CSF pourrait également empêcher directement le remodelage ventriculaire, en favorisant la synthèse de collagène^{165,166}, en limitant la mortalité des cardiomyocytes^{110,264}, et en augmentant l'expression du VEGF, l'activation d'Akt et la production de NO dans la région ischémique. Le G-CSF peut également favoriser la néovascularisation^{185,256,265} mais aussi augmenter le nombre de cellules progénitrices cardiaques Sca-1⁺ résidant dans le cœur¹⁶⁸.

Les principales conclusions de cette première partie du 4^{ème} chapitre, qui étudie l'impact de l'induction d'un IM et d'un traitement par du G-CSF sur les paramètres sanguins et sur les cellules progénitrices, sont que : (1) les CPM et les CPE sont mobilisées dans le SP après une ischémie cardiaque ; et (2) le traitement par du G-CSF augmente davantage leur mobilisation et est nécessaire à la mobilisation des CPH après un IM aigu. Il apparaît également que la mobilisation des cellules progénitrices dans la circulation est parallèle à l'épuisement de leur « pool » dans la MO.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons examiné l'influence du G-CSF sur la survie, la perfusion myocardique, le remodelage ventriculaire et l'évolution hémodynamique après un IM. Comme nous l'avons décrit précédemment dans le chapitre II, nous obtenons dans notre modèle animal un taux de survie de 70% et une lésion ischémique atteignant 50-60% du tissu cardiaque. Les animaux montrent des signes de cardiomyopathie post-ischémique dilatée et de remodelage cardiaque caractérisés par l'hypertrophie et la dilatation du VG. L'administration de G-CSF améliore la survie des souris ligaturées à 83% quand elles reçoivent du G-CSF 5 jours après l'IM, et à 100% quand le traitement est commencé 5 jours avant l'IM et poursuivi 5 jours après. Le remodelage du VG est également amélioré par le G-CSF, comme le montre la diminution du poids du cœur et de la taille du VG.

Nous avons alors évalué l'impact de l'administration du G-CSF sur le déficit de la perfusion et avons observé que ce paramètre, ainsi que la taille de l'infarctus, sont sensiblement diminués après 10 jours de G-CSF. Nous obtenons également une évolution favorable de la perfusion entre les jours 1 et 7 chez les animaux recevant du G-CSF. Le nombre d'artéριοles CD31-positives dans le cœur est également augmenté. Ces artéριοles sont localisées à la périphérie de l'IM et il est possible que ces vaisseaux proviennent d'artères collatérales. Ces résultats confirment ceux de Deindl et al., lesquels ont constaté que l'administration de G-CSF après la survenue d'un IM est associée à un phénomène d'artériogenèse ; cependant, contrairement à nous, ils n'ont pas effectué de mesures de la perfusion¹⁴⁷. Kocher et al. avaient précédemment démontré que les CS de la MO sont, lors d'un IM, à l'origine de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, mais également de la multiplication des structures vasculaires préexistantes²⁶⁴. Une étude menée par Norol et al. montre chez le singe une amélioration de la perfusion dans la région bordant l'IM après un traitement par G-CSF¹⁷⁰. Des résultats similaires ont été également décrits chez la souris¹⁶³. L'augmentation de la survie après administration de G-CSF peut s'expliquer par l'amélioration de la perfusion chez les animaux traités.

Une évaluation hémodynamique de la fonction cardiaque a également été réalisée. Nous pouvons observer une amélioration de certains paramètres de la fonction cardiaque mais non de tous. Notons cependant que Harada et al. ont observé un effet dépendant de la dose de G-CSF sur la fonction cardiaque, avec l'effet positif maximum obtenu pour une dose élevée de 100µg /kg/jour, administrée directement après l'IM¹¹⁰. Dans notre protocole, les animaux reçoivent quotidiennement 50 µg/kg de G-CSF.

Nous pouvons observer un effet direct sur la fonction systolique un jour après le début du traitement. Nous constatons une augmentation du débit cardiaque (NS) ainsi que de la déformation de la paroi dans la zone ischémisée. Après 7 jours de traitement, le débit cardiaque

est presque totalement corrigé mais la FEVG reste inchangée. Les paramètres de déformation du VG obtenus par l'analyse Doppler ne sont pas normalisés une semaine après l'infarctus. D'un point de vue hémodynamique, la constante de relaxation liée au temps Tau-W augmente au-delà des valeurs normales après l'administration de G-CSF. De même, la PFD s'accroît fortement alors que le VFD reste inchangé. Ces données indiquent respectivement une altération de la relaxation isovolumétrique et une diminution de la compliance du VG. La PFS est corrigée par l'administration du G-CSF, et le travail myocardique est sensiblement amélioré chez les souris traitées par 10 jours de G-CSF. Au regard de ces résultats, une hypothèse serait qu'un traitement par du G-CSF s'accompagne d'une rigidification de la paroi du VG, ce qui pourrait expliquer l'atténuation de la dilatation de cavité, mais également la faible déformation obtenue par l'analyse strain. Cette hypothèse peut également fournir une explication à la hausse de la pression diastolique : la pression s'accroît lors du remplissage isotonique du ventricule, puisque la taille de cavité ne peut pas augmenter en raison d'une diminution de la compliance.

Contrairement à certaines études précédentes, l'administration de G-CSF chez des souris souffrant d'IM n'est pas suffisante pour améliorer par elle-même la fonction systolique et diastolique du VG. Certains ont observé que la mobilisation de CS par le G-CSF améliorerait la fonction du VG et le remodelage ventriculaire dans un modèle animal²⁶⁶. Un traitement associant le G-CSF à du SCF améliorerait les performances cardiaques en augmentant le nombre de vaisseaux sanguins et de cellules de la lignée cardiomyogénique. Cependant, ces cellules nouvellement formées étaient d'origine myocardique plutôt que médullaire²⁶⁷. D'autre part, Ieishi et al. n'ont obtenu une amélioration hémodynamique que lorsque l'artère coronaire ligaturée est reperfusée après 30 minutes²⁶⁸. Chez les rats présentant une ligature permanente, il n'y avait pas de différence significative entre les animaux recevant un tampon salin ou du G-CSF pour les paramètres EPVG, FEVG ou pour la proportion du muscle atteint par l'ischémie²⁶⁸. Une étude récente n'a montré aucun impact sur la restauration cardiaque d'un traitement par du G-CSF (50µg/J pendant 7 jours, ou 4 cycles de 5 jours à 10µg/J) chez des rats souffrant d'infarctus chronique du myocarde²⁶⁹.

D'autre part, le G-CSF pourrait également agir directement sur le remodelage du VG. De la même façon qu'il intervient lors de blessures cutanées^{270,271}, il est possible que le G-CSF participe au processus de réparation du myocarde en modulant la réponse inflammatoire et les dépôts de collagène¹⁶⁵. Les résultats découlant de l'expérimentation animale suggèrent plusieurs mécanismes d'action potentiels du G-CSF sur le tissu cardiaque ischémique: promotion de la synthèse de collagène¹⁶⁵, diminution de la mort des cardiomyocytes¹¹⁰, augmentation de l'expression du VEGF et de d'Akt dans la région ischémique^{169,272,273}. Par

exemple, une étude réalisée chez le porc a montré que la fonction régionale dans le segment hypovascularisé est corrigée après l'administration de G-CSF, mais sans impact sur la taille de l'infarctus²⁷⁴. D'autres études ont également observé un effet positif du G-CSF sur la dilatation ventriculaire¹⁸ ou sur la réserve contractile cardiaque^{165,166}, mais sans réduction de la taille de l'infarctus. Lee et al. ont montré que l'administration du G-CSF chez le rat augmentait, 2 mois après ligature de l'artère coronaire, la fraction d'éjection du ventricule gauche et s'accompagnait d'une diminution significative du DIVGd. Toutefois, l'administration du G-CSF aboutit également à l'activation de la nestine, l'expression du « nerve growth factor » et l'augmentation de la réinervation sympathique et cela augmentait les réponses arhythmogènes²⁷⁵.

Récemment, l'efficacité de la thérapie par G-CSF lors d'un IM a également été évaluée au travers de plusieurs études cliniques, avec des résultats mitigés. L'étude FIRSTLINE-AMI rapporte un effet bénéfique du G-CSF sur la fonction du VG au travers de l'amélioration de la FEVG¹⁷⁹ ; cependant, les études randomisées contre placebo STEMMI²⁶¹ et REVIVAL-2¹⁹⁰ n'ont pas confirmé cet effet positif. Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par des différences dans la conception des études. Néanmoins, l'administration de G-CSF après la reperfusion du myocarde infarci semble sûre, avec des taux identiques de re-sténose dans les groupes recevant le G-CSF et dans les groupes contrôles^{76,178,180,190}.

Les différences de réponse observées entre les souris traitées par du G-CSF pendant 5 jours avant l'IM, suivi de 5 jours supplémentaires et celles recevant seulement 5 jours de G-CSF après l'occlusion de l'artère coronaire soulèvent la question de la fenêtre thérapeutique la plus efficace. La taille de l'infarctus et le déficit de perfusion tendent à diminuer après 5 jours de G-CSF, mais cela n'est statistiquement significatif qu'après 10 jours de traitement. De plus, bien que la survie soit améliorée après 5 jours de G-CSF, nous n'observons plus aucun décès parmi des animaux déjà traités avant l'occlusion de l'artère. De même, s'il est vrai que la taille de la zone nécrosée et le déficit de perfusion tendent à s'améliorer avec 5 jours de G-CSF, ils ne sont statistiquement diminués qu'après 10 jours de traitement. Cependant, le poids du cœur est déjà normalisé par 5 jours de G-CSF. Alors que les paramètres hémodynamiques semblent indiquer un effet plus important lorsque le G-CSF est administré avant et après l'IM, les données échocardiographiques sont similaires entre les deux timings d'injection. Par exemple, le travail myocardique et la pression de fin de systole sont améliorés quand le traitement est initié avant la ligature.

Les différences observées entre les deux timings de délivrance du G-CSF peuvent être le résultat de la présence de CS dans le SP avant la lésion ischémique, facilitant de ce fait leur homing précoce dans la zone de l'IM. D'autres explications envisageables incluent une

prolifération et une différenciation plus rapides de CS déjà situées dans le myocarde²⁷⁶, ou une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes¹²⁹ et des cellules endothéliales¹³¹ déjà stimulées par le G-CSF avant l'accident vasculaire. L'amélioration de la perfusion, déjà évidente le lendemain de l'IM chez les souris traitées préalablement avec du G-CSF, doit être la conséquence d'un processus rapide tel que l'ouverture de vaisseaux collatéraux ou encore la prévention de l'apoptose ; en effet, ce délai est trop court pour envisager un phénomène de vasculogénèse. Toutefois, cette amélioration rapide de la perfusion peut être due à un processus d'angiogénèse si l'on envisage que la formation des nouveaux vaisseaux sanguins débute dès le premier jour de l'administration de G-CSF. Comme suggéré par les images de perfusion myocardique obtenues en μ SPECT, deux mécanismes ont pu avoir lieu concomitamment; en effet, nous avons observé soit une amélioration homogène de la perfusion, soit plusieurs localisations focales où la perfusion était augmentée. Contrairement à nos observations, Ohtsuka et al. ont constaté que lorsqu'ils débutaient le traitement par G-CSF après l'induction de l'IM, ils obtenaient une amélioration de la perfusion tout aussi efficace que lorsque les animaux étaient pré-traités. Notons cependant que les souris ont reçu une dose de G-CSF quotidienne deux fois supérieure à celle de notre protocole expérimental¹⁶³.

Signalons qu'au cours de cette partie du travail, quelques résultats apparemment contradictoires sont apparus. Bien que le diamètre de la cavité du VG mesuré par l'échocardiographie et le volume de VG évalué par des mesures pression-volume en sonde à conductance montrent une évolution parallèle, nous observons des différences entre les valeurs absolues de ces 2 paramètres. Ces différences peuvent être expliquées par les difficultés techniques rencontrées : la fréquence cardiaque très élevée et la petite taille du cœur de souris nécessitent une résolution très importante pour l'obtention de mesures précises. La qualité de la sonde est particulièrement critique en échocardiographie et il n'est malheureusement pas facile d'être parfaitement reproductible quant à la position de la sonde pour réaliser les mesures de diamètres. Cependant, l'évaluation des déformations par l'analyse des images Doppler s'avère fiable chez la souris¹⁹⁸ et pourrait ainsi constituer une technique importante pour l'évaluation de la fonction cardiaque chez le petit animal. D'autre part, nous obtenons, lors de l'étude de la fonction myocardique, une fréquence cardiaque basse, malgré l'utilisation d'un mélange d'anesthésiques, composé de kétamine à 100 mg/kg et xylazine à 0.1 mg/kg. Ce protocole d'anesthésie a été décrit comme permettant de travailler à une fréquence cardiaque élevée et stable, avec une fréquence de raccourcissement élevée et induisant un minimum d'effets sur la dimension intérieure du VG à la fin de la diastole¹⁹⁵. De plus, nous avons évalué d'autres protocoles d'anesthésie, tels que le pentobarbital (30 mg/kg)

et l'isoflurane, et avons observé les mêmes conséquences sur la fréquence cardiaque. Néanmoins, cette fréquence cardiaque observée dans cette étude est comparable entre les quatre groupes de souris analysées.

En résumé, un traitement par G-CSF dans l'infarctus du myocarde est une thérapeutique non invasive qui suscite un vif intérêt mais qui nécessite des évaluations approfondies au travers d'études en double aveugle et randomisées. Nos résultats démontrent que l'administration du G-CSF dans un modèle murin d'IM améliore la survie, le remodelage et la perfusion cardiaque, et induit également des modifications de certains paramètres fonctionnels cardiaques. En effet, cette cytokine rétablit partiellement la fonction myocardique mais diminue la compliance du muscle cardiaque. Il sera nécessaire, lors de futures études, de réduire les délais entre la survenue de l'IM et l'injection du G-CSF, d'appliquer des techniques d'imagerie médicale avancées, et de se concentrer sur les effets à long terme, avant d'obtenir des conclusions fermes quant à l'intérêt d'un traitement par G-CSF après un IM.

De façon préliminaire, nous avons évalué l'intérêt d'une approche thérapeutique par du VEGF dans notre modèle murin d'IM. Le gène codant le VEGF est constitué de 8 exons, dont le 5^{ème} comporte le site principal de clivage protéolytique. Pierre Mineur a observé que certains agents chimiothérapeutiques (camptothecin, doxorubicin, mitomycin C, taxol et vincristine), ainsi que les UV-B, induisaient l'expression d'un nouvel isoforme de VEGF (VEGF111, identification de GenBank : DQ229900) codé par les exons 1 à 4 et 8²⁷⁷ dans certaines cellules humaines. Il s'agit du premier VEGF humain décrit, ne possédant pas d'exon 5. Il n'est pas détecté dans la majorité des tissus humains normaux, et est résistant à la protéolyse par la plasmine et les fluides collectés à partir de lésions chroniques.

Nos résultats montrent que les effets thérapeutiques du VEGF lors d'une ischémie du muscle cardiaque sont importants. Les données préliminaires que nous avons recueillies indiquent que le VEGF résistant à la protéolyse est plus efficace que le VEGF classique dans le traitement de l'IM. De nouvelles données ont montré que l'administration de VEGF peut améliorer la perfusion des tissus par néovascularisation dans des modèles animaux d'IM²⁷⁸ ou d'ischémie de la patte²⁷⁹. De plus, il semblerait que l'effet du VEGF ne soit pas limité à un impact direct sur l'angiogenèse, mais pourrait également mobiliser les CPE de la MO, et augmenter la vasculogenèse post-natale *in situ*²⁷⁸. Pitchford a récemment décrit que le VEGF stimule les CPH à entrer dans le cycle cellulaire et supprime leur mobilisation. Par contre, il

augmente la mobilisation des CPE via le VEGFR2, en réponse à l'antagonisme du CXCR4²³⁰.
Ces résultats pourraient être amplifiés par l'utilisation du VEGF résistant à la protéolyse.

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'intérêt de la thérapie cellulaire, et du traitement par G-CSF en particulier, dans le cadre d'une réparation tissulaire cardiaque après ischémie.

Dans la **première partie**, nous avons isolé, amplifié *in vitro* et caractérisé des CSM d'origines humaine et murine. Nous avons démontré que la croissance des CSM est fortement influencée par la densité des cellules mises en culture mais également par la composition du milieu. Les conditions d'expansion *ex vivo* devront donc être adaptées en prenant ces paramètres en considération lors d'essais ultérieurs en thérapie cellulaire chez l'humain. De plus, l'utilisation de sérum d'origine animale étant peu idéal pour les usages cliniques, les conditions d'expansion de CSM en absence de sérum devront être déterminées, par exemple en enrichissant le milieu par des facteurs de croissance. Une alternative envisageable serait d'amplifier les CSM dans un milieu supplémenté par un sérum provenant du même donneur que ces cellules. Toutefois, la variabilité d'amplification des CSM entre patients risque d'être accrue lors de l'utilisation d'un sérum autologue. La mise au point de conditions optimisées d'isolement et d'expansion *ex vivo* de ces cellules pourrait déboucher sur la commercialisation de produits cellulaires standardisés pour des applications en médecine humaine. L'élaboration de milieux de culture standardisés sans sérum humain ou animal constitue un intérêt certain pour des firmes commercialisant ces milieux comme produits pharmaceutiques ou à destination d'institutions de recherche.

Nous avons ensuite démontré que nous obtenons une culture homogène de CSM humaines après deux passages, et murines après sept passages. Les cellules présentant alors le phénotype attendu des CSM c'est-à-dire que les cellules humaines sont négatives pour les antigènes CD31, CD34, CD45, CD80 et HLA-DR et positives pour les antigènes HLA-1, CD73, CD90 et CD105 et que les cellules isolées à partir de moelle de souris sont négatives pour les CD45 et 11b et expriment faiblement le CD34 et fortement les antigènes CD106 et Sca-1. D'autre part, nous avons déterminé un critère assez simple pour isoler des CSM reposant sur leur taille et leur densité cellulaire. Dans les 2 espèces, ces deux paramètres sont supérieurs à l'ensemble des autres cellules : nous parlons de la population CSM « FSC^{high} SSC^{high} ». Nous avons démontré par des tests clonogéniques et de différenciation que, malgré l'expansion *ex vivo*, des cellules indifférenciées sont présentes dans nos cultures. Afin de déterminer si chaque cellule possède des propriétés de différenciation similaires, nous pourrions envisager une expérience au cours de laquelle une cellule unique serait placée en

culture puis amplifiée. Les cellules descendantes seraient alors testées pour leur potentiel de différenciation en adipocytes, chondrocytes, ostéocytes ainsi que cardiomyocytes. Il serait intéressant de pouvoir poursuivre cette caractérisation des CSM par une étude de leur profil d'expression de facteurs de transcription et de protéines. En effet, Wagner et al. ont démontré que les conditions de culture modifient de façon majeure l'organisation cellulaire des CSM, mais également leur transcriptome et protéome²⁸⁰.

Les propriétés d'induction de la différenciation des CSM en cardiomyocytes par de la 5-azacytidine ont été décrites. C'est pourquoi, nous avons évalué les conséquences de l'exposition à cet agent sur les caractéristiques de nos cellules. Malgré l'apparition de propriétés spécifiques aux cellules cardiaques, telles que l'expression de l' α -actinine, la réorganisation en périphérie de la cellule de la connexine 43, des variations de leur concentration en calcium et une force de contraction amplifiée, les CSM ne semblent pas complètement différenciées en cardiomyocytes. En effet, nous n'observons pas d'apparition de battements spontanés des cellules et, à l'exception de l'augmentation de la concentration en MEF2 liée au développement myogénique, aucun autre marqueur de la voie myogénique ou cardiomyogénique n'est exprimé. Les CSM traitées par de la 5-azacytidine semblent entamer un processus de différenciation en cellules cardiaques, processus somme toute partiel. Ces cellules pourraient garder une certaine plasticité après le traitement *in vitro* et nécessiter un micro-environnement *in vivo* approprié pour achever leur différenciation.

Nous avons ensuite vérifié l'expression de la GFP dans les CSM afin de préparer des greffons de cellules facilement identifiables par leur fluorescence, lors de leur administration ultérieure chez des animaux souffrant d'IM. Nous avons constaté que dans la MO de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente GFP, l'expression de cette protéine n'est pas ubiquitaire puisqu'elle ne concerne que 30% des cellules médullaires. Nous avons montré que l'expression du transgène est stable dans les CSM mais pas dans les CSH. De plus, l'expression de la GFP semble se perdre au cours des divisions et de la différenciation cellulaire. La détection de ce gène « reporter » dans les expériences de greffe risque donc d'induire une sous-estimation importante de la participation des CS aux phénomènes de réparation tissulaire. C'est pourquoi nous avons mis au point un protocole de transduction des CSM par un lentivirus exprimant l'eGFP. Alors que les taux de transfection sont proches de 100% pour les cellules humaines, celles d'origine murine, moins permissives, nécessitent une sélection des cellules fluorescentes préalablement à la greffe. Une perspective intéressante émanant de ces observations serait de déterminer les mécanismes moléculaires qui sous-

tendent les différences d'expression du transgène entre les deux types de CS. D'autre part, l'usage de cellules transfectées par des rétrovirus serait intéressant afin de déterminer si les cellules formées de novo lors de lésions tissulaires traitées par thérapie cellulaire proviennent des cellules du greffon. En effet, la transfection par des rétrovirus permet une intégration stable dans le génome ainsi que le suivi de l'expression du gène reporter dans la descendance ; il rend également possible la détermination du mécanisme par lequel les CS interviennent dans les phénomènes de réparation tissulaire cardiaque.

L'augmentation du champ d'application des CS ouvrira très certainement de nouvelles perspectives industrielles. En effet, les CSH prélevées à partir de moelle osseuse, de sang périphérique ou de sang de cordon, sont déjà utilisées à grande échelle pour le traitement d'affections hématologiques et cancéreuses graves. De plus en plus d'institutions hospitalières se dotent de laboratoires de thérapie cellulaire et génique, permettant ainsi la production à échelle thérapeutique de produits cellulaires, dans des conditions GMP (Bonnes pratiques de fabrication) comparables à celles de l'industrie pharmaceutique. De nombreuses firmes de biotechnologie débutent dans le développement de la thérapie cellulaire à partir de cellules souches somatiques. C'est pourquoi, la mise au point de la technologie pour l'isolement, l'expansion, la conservation et la transplantation de cellules souches mésenchymateuses permettra d'élargir considérablement le champ de la thérapie cellulaire réparatrice aux maladies ostéo-articulaires, neurologiques, vasculaires ou hépatiques. En effet, les CSM isolées à partir de la moelle, mais, récemment, également à partir de sang de cordon ombilical²⁸¹, sont capables de se différencier en une variété de tissus non-hématopoïétiques d'origine mésodermique comme de l'os²⁶, le cartilage²⁵⁹, le tendon²⁸², les cellules graisseuses²⁸³, le neuro-ectoderme²⁸⁴, l'épithélium²⁸⁵, le muscle squelettique²⁸⁶ et cardiaque²¹⁶. De plus, en raison de leurs propriétés facilitatrices et immunosuppressives, les cellules souches mésenchymateuses pourront être utilisées pour améliorer la prise du greffon ou pour contrôler les réactions du greffon contre l'hôte après greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Dans la **deuxième partie**, nous avons mis au point un modèle d'infarctus du myocarde par occlusion de l'artère coronaire chez la souris, ainsi que les techniques d'histologie et d'immunohistologie qui permettront d'analyser la régénération tissulaire cardiaque après traitement. Nous avons également évalué l'impact d'un IM sur la perfusion et les performances hémodynamiques cardiaques chez la souris grâce aux techniques de μ SPECT, d'échocardiographie et de cathétérisme cardiaque que nous avons spécifiquement adaptées à un usage chez le petit animal. Nous avons déterminé une série de paramètres que nous

pourrons suivre pour déterminer l'impact d'un traitement par thérapie cellulaire ou lors de la mobilisation de CS par du G-CSF. Concrètement, nous pourrons évaluer des modifications de la survie ainsi qu'une éventuelle amélioration du point de vue anathomopathologique tels qu'une diminution de l'infiltration cellulaire du tissu cardiaque, de la taille de l'infarctus et des phénomènes de remodelage ventriculaire. Ce dernier point se traduit par une diminution de la dilatation du VG, un moindre amincissement de la paroi et une augmentation plus limitée du poids du cœur. Les marquages immunohistologiques nous permettront également d'apprécier une éventuelle amélioration de l'organisation des fibres cardiaques. Nous avons ensuite démontré que la technique du μ SPECT est réalisable chez la souris et permet une détermination précise de la taille de l'infarctus. Nous obtenons une excellente corrélation entre la taille de la zone ischémisée mesurée par μ SPECT et celle obtenue par les techniques histologiques de coloration au TTC ou trichrome. Nous avons également observé un faible taux de variation des valeurs inter-observation ou inter-observateur. Et enfin, il sera intéressant d'évaluer si les modifications de perfusion du muscle cardiaque sont corrélées à une expression différente de l'antigène CD31. A notre connaissance, aucune étude réalisée précédemment n'avait associé les techniques échocardiographiques, de sonde à conductance et de μ SPECT pour l'étude de la physiopathologie cardiaque chez la souris.

Ces expériences s'étant concentrées sur un modèle d'infarctus du myocarde, et puisque nous disposons à présent de techniques permettant de détecter des altérations de l'histologie et de la fonction cardiaque, il serait intéressant de développer d'autres modèles de pathologie cardiaque. En effet, les cardiomyopathies toxiques, inflammatoires, alcooliques ou du post-partum, peuvent également aboutir à une décompensation cardiaque sévère dont la seule solution pour les cas les plus graves est la transplantation cardiaque : il est donc judicieux de vérifier l'utilité d'une approche par thérapie cellulaire dans un autre modèle, comme par exemple celui de la cardiomyopathie toxique induite par les anthracyclines.

Dans la **troisième partie**, nous avons étudié la capacité du G-CSF à mobiliser les CSH, CSM et PE, ainsi que la cinétique selon laquelle ce phénomène se déroule. Nous avons également évalué l'impact d'un traitement par du G-CSF sur la MO ainsi que la capacité clonogénique des CS de la MO et du SP. Nous avons démontré que l'administration de G-CSF chez les souris saines induit la mobilisation dans le SP de CPH, CPM et CPE, selon une cinétique spécifique à chaque type de cellules progénitrices. C'est après trois jours de traitement par du G-CSF que nous observons un nombre maximum des trois types de progéniteurs dans la SP : ce serait donc le jour le plus approprié pour collecter par aphérèse une population enrichie en CPH, CPM et CPE. Toutefois, ce jour de collecte est à adapter

spécifiquement à chaque type de cellules progénitrices. En effet, le nombre de CPH reste stable pendant les 10 jours d'administration du G-CSF, à l'exception de deux pics apparaissant aux J2 et J7, suivis chaque fois d'une augmentation importante de ces cellules dans le SP. Nous avons observé une mobilisation dans le SP des CPM à partir du 2^{ème} jour avec un nombre constant de ces cellules jusqu'au J10, tandis que le nombre de CPM de la MO est maximum au J2 avant de diminuer progressivement. Et enfin, nous avons constaté une mobilisation importante des CPE aux J3 et J4, qui se stabilise par la suite à un taux intermédiaire. Dans la MO, les CPE augmentent graduellement pour atteindre une concentration maximale au 7^{ème} jour de G-CSF et enfin revenir à des valeurs basales. Dans nos expériences, nous n'obtenons pas une corrélation parfaite entre le nombre de CPH et de CPM détectées par cytométrie de flux et le nombre de CFU (CFU-GM et CFU-F respectivement) formées. Ces résultats pourraient s'expliquer par une activation du cycle cellulaire par le G-CSF et donc probablement par la présence de cellules progénitrices à un stade plus différencié. Afin de déterminer si le G-CSF a effectivement un impact sur la capacité clonogénique et l'évolution dans le cycle cellulaire des CS, il serait intéressant de réaliser *in vitro* des cultures de CPH, CPM et CPE en présence de ce facteur de croissance. Nous pourrions alors évaluer la capacité clonogénique et la propension à cycliser des CS mais également déterminer si un traitement *ex vivo* par du G-CSF affecte leurs phénotypes et leurs capacités de différenciation. Un des modèles permettant d'étudier l'angiogenèse et qui consiste à cultiver *in vitro* des anneaux d'aorte, pourrait également être la source de nombreuses informations quant à l'influence du G-CSF sur la croissance des vaisseaux sanguins.

Nous avons ensuite démontré qu'un traitement par du G-CSF augmente la perfusion myocardique chez des souris saines. De plus, l'analyse échocardiographique et les mesures de pression-volume ont démontré que l'administration de G-CSF a un impact sur la fonction hémodynamique cardiaque. Plus particulièrement, le G-CSF semble diminuer la contractilité du muscle cardiaque ainsi que la capacité de déformation du VG, ce qui peut-être le résultat d'un effet rigidifiant du G-CSF. Il est donc important de garder à l'esprit que G-CSF peut avoir un impact direct sur la perfusion et les performances hémodynamiques cardiaques.

Nous avons mis au point des techniques de culture cellulaire et de cytométrie en flux permettant de déterminer le nombre de CSH, CSM ou de PE dans le SP ou dans la MO chez trois patients sains mobilisés par du G-CSF ou de l'EPO. En effet, la connaissance de la cinétique de mobilisation des CS est indispensable au développement de protocoles

optimisés pour la thérapie cellulaire qui font appel à la collecte suivie de l'injection de ces cellules. Nous pouvons identifier les CPH, CPM et CPE et observer une variation de leur concentration au cours d'un traitement par du G-CSF, non seulement en cytométrie de flux, mais également par tests fonctionnels clonogéniques. Maintenant que le protocole est parfaitement établi, nous pouvons initier un protocole clinique chez des sujets sains que nous mobiliserons par du G-CSF et par de l'EPO. Nous voudrions ultérieurement élargir cette étude à des patients souffrants de cardiopathie ischémique chronique stable, sans possibilité de revascularisation, afin d'évaluer l'impact de la mobilisation des CS sur leur fonction cardiaque. Nos objectifs seront donc de comparer chez ces patients les propriétés du G-CSF et/ou de l'EPO sur :

- a) La richesse médullaire en CSH, CSM et PE, par rapport à des sujets normaux.
- b) La cinétique de mobilisation dans le sang de leurs CSH, CSM et PE.
- c) L'effet de cette mobilisation de CS sur la perfusion et la fonction myocardique des patients.

Plus particulièrement, les CPE sont mobilisées dans le SP de patients, non seulement après administration de G-CSF²⁸⁷, mais également suite à un IM aigu^{135,288}. Cependant, la présence de ces cellules en circulation semble insuffisante pour aboutir à un bénéfice clinique chez les patients souffrant d'ischémie cardiaque : cela pourrait s'expliquer par un déficit du mécanisme de homing des CPE chez les sujets cardiaques^{148,149}.

Il serait intéressant de compléter cette étude par la réalisation systématique de dosages biologiques sur les sérums des patients ainsi que sur ceux des souris en expérimentation. Cela nous permettrait de quantifier les chémokines, facteurs de croissance et métalloprotéinases impliqués dans la mobilisation des progéniteurs. C'est la raison pour laquelle nous avons systématiquement congelé le sérum de chaque souris et de chaque patient que nous avons reçu, afin de constituer une sérothèque permettant des analyses ultérieures.

Dans la **quatrième partie** de ce travail, nous avons examiné si la survenue d'un infarctus du myocarde pouvait affecter le nombre de progéniteurs dans le SP et la MO et avons par la suite étudié la contribution du G-CSF à la réparation du tissu cardiaque dans notre modèle murin de ligature de l'artère coronaire. Suite à nos expériences, nous avons pu conclure que:

1. Les globules blancs augmentent dans le SP et diminuent dans la MO suite à l'induction d'un IM **et/ou** du traitement par du G-CSF.

2. Les CPH et les CFU-GM augmentent dans le SP suite à un traitement par du G-CSF chez les animaux sains ou souffrant d'IM, mais **ne sont pas** modifiées par l'apparition de l'ischémie seule. Les CPH sont moins nombreuses dans la MO des animaux souffrant d'IM mais augmentent après un traitement par du G-CSF, aussi bien chez les animaux sains que chez ceux souffrant d'IM. Les CFU-GM, quant à elles, diminuent fortement, uniquement chez les souris ligaturées traitées par le facteur de croissance.
3. Les CPM et les CPE sont augmentées dans le SP suite à l'induction d'un IM **et/ou** du traitement par du G-CSF. Ces cellules sont moins nombreuses dans la MO des animaux souffrant d'IM mais augmentent après un traitement par du G-CSF, aussi bien chez les animaux sains que chez ceux souffrant d'IM.
4. Le nombre de CFU-F augmente dans le SP et diminue dans la MO suite à l'induction d'un IM **et/ou** du traitement par du G-CSF.
5. La concentration plasmatique en troponine T augmente après un IM puis est significativement diminuée par un traitement au G-CSF. De plus, le G-CSF et le SDF-1 augmentent également dans le sang périphérique après un IM ; cette augmentation semble limitée par l'injection de G-CSF.
6. La survie est significativement améliorée après un traitement par du G-CSF administré 5 jours avant l'induction de l'IM et 5 jours après.
7. Le poids du cœur est normalisé par un traitement par du G-CSF.
8. La taille de l'infarctus et l'infiltration du tissu cardiaque par des globules blancs sont diminuées au terme de 10 jours de G-CSF.
9. La perfusion cardiaque est améliorée suite à 10 jours de traitement par du G-CSF.
10. Les performances hémodynamiques cardiaques ne sont que partiellement améliorées par un traitement par du G-CSF tandis que, au contraire, la compliance et la capacité de déformation du VG semblent réduites.

Nos résultats démontrent que l'administration du G-CSF dans un modèle murin d'IM améliore la survie, le remodelage et la perfusion cardiaque et induit également des modifications de certains paramètres fonctionnels cardiaques.

Bien que Yang et al. aient démontré que la décompensation cardiaque ultérieure à l'ischémie apparaît chez la souris après une semaine (ce qui explique notre choix de sacrifier les souris au J7 post IM)²⁸⁹, nous voudrions étudier à long terme (J30 et J60) l'évolution du remodelage et des performances cardiaques de souris traitées par du G-CSF. D'autre part, une autre possibilité serait de commencer les injections de G-CSF une semaine après la survenue de l'IM, au moment où le SDF-1 augmente, ou encore d'allier l'administration du G-CSF à

une thérapie génique grâce à laquelle serait surexprimé le SDF-1¹²⁸. Cependant, afin d'assurer un homing maximum des CS mobilisées dans le tissu cardiaque, il faudrait synchroniser le pic de ces cellules dans le SP et celui des chémoattractants exprimés par le cœur. Le SDF-1, le « leukemia inhibitor factor » et l'« hepatocyte growth factor » sont sécrétés le plus intensément dans le tissu cardiaque 24 à 72H après l'apparition de l'IM²⁹⁰.

Les principales limitations de cette étude sont la différence physiologique et anatomique entre le cœur de souris et celui de l'homme. En effet, avec une taille d'infarctus atteignant plus de 50% du muscle cardiaque, et des animaux présentant tous les signes d'une décompensation cardiaque, nous obtenons, sans traitement, seulement 30% de décès, ce qui est peu par rapport à ce que l'on observerait dans des conditions identiques chez l'homme. Pons et al. ont confirmé que les modèles murins peuvent fournir des connaissances indispensables aux pathologies cardiaques humaines^{148,149,223}. La différence entre le temps nécessaire à l'apparition du remodelage cardiaque chez l'homme comparé à celui nécessaire chez la souris doit être prise en considération lors de l'extrapolation des résultats. De plus, chez la souris, contrairement à l'homme, la rate reste un site actif de l'hématopoïèse et de nombreuses CSH migrent dans cet organe : cela peut être à l'origine des différences entre la production des cellules progénitrices hématopoïétiques dans la MO et leur concentration dans le SP mais également être la source de dissemblances entre les deux espèces quant à la cinétique de mobilisation des CS. Et enfin, Norol et al. émettent les restrictions suivantes sur la translation à l'homme des résultats obtenus chez la souris: ils considèrent que la mobilisation des CS par du G-CSF a un impact sur la restauration tissulaire cardiaque chez la souris et non chez le singe, parce qu'il n'existe pas de « vraies » CS chez les primates ou l'homme. De plus, ils avancent que la nature et le nombre de cellules mobilisées par du G-CSF peuvent certainement varier d'une espèce à l'autre¹⁷⁰. Kuznetsov et al.⁶ ont rapporté l'isolement de « fibroblast-like cells » clonogéniques, à fort potentiel ostéogénique et adipogénique à partir du sang de quatre espèces de mammifères, dont les souris et les humains. Cependant, Roberts et al.²⁹¹ ont clairement démontré qu'il existe différentes réponses au G-CSF entre les souches de souris, ce qui indique que la mobilisation des cellules dépend d'un trait génétique complexe. Certains patients sont également « incapables » de mobiliser un nombre suffisant de cellules souches périphériques dans le sang après l'injection de G-CSF (« poor mobilizers »). Lucas et al. ont également montré que la mobilisation des CSH dépend de rythmes circadiens spécifiques aux espèces qui sont inversés chez l'homme par rapport à la souris²⁹².

Nous avons enfin évalué de façon préliminaire l'effet du VEGF dans notre modèle murin d'IM, ainsi que d'une molécule de VEGF délétée de son exon 5, la rendant résistante à

la protéolyse induite par la plasmine. L'intérêt d'un traitement par du VEGF en réparation tissulaire cardiaque semble évident et l'avantage de la molécule résistante à la protéolyse est indéniable.

Les perspectives de ce travail seraient de déterminer dans ce modèle murin l'impact de l'association de différents facteurs de croissance tels que le SCF et l'EPO avec le G-CSF et/ou le VEGF, mais également d'évaluer le potentiel de greffes de CS sur la réparation tissulaire cardiaque et de déterminer si cette orientation thérapeutique aboutirait à de meilleurs résultats que la mobilisation par du G-CSF, et cela notamment sur les performances hémodynamiques. Concrètement, nous pourrions apprécier de façon parallèle les propriétés réparatrices cardiaques de différents greffons tels que des greffons de moelle complète, ou alors de cellules spécifiques telles que les CSM indifférenciées ou différenciées en cardiomyocytes. Il serait également intéressant d'évaluer plusieurs délais d'administration (soit à la phase précoce lésionnelle, soit à la phase tardive de cardiomyopathie), différentes doses de cellules ainsi que plusieurs voies d'administration (intraveineuse et intracardiaque). La position dans le cycle mitotique des cellules (CS quiescentes versus CS en cycle mitotique) constitue également un paramètre pouvant affecter l'efficacité d'une greffe. Cette revue systématique de l'implication des cellules souches dans les phénomènes de réparation tissulaire cardiaque nous permettra tout d'abord de diminuer les variations dues à des protocoles distincts (isolement des cellules souches, nombre de cellules administrées...) entre laboratoires différents, mais également de déterminer le mode opératoire optimal permettant un passage à la thérapie cellulaire chez l'Homme.

Bibliographie

Bibliographie

- (1) Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 2007;109:4245-4248.
- (2) Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007;109:1743-1751.
- (3) Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006;20:161-171.
- (4) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-228.
- (5) Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109:235-242.
- (6) Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001;153:1133-1140.
- (7) Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001;98:2396-2402.
- (8) Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44:215-230.
- (9) Banfi A, Bianchi G, Notaro R et al. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng*. 2002;8:901-910.
- (10) Wagner W, Horn P, Castoldi M et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE*. 2008;3:e2213.
- (11) Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp*. 2005;265:55-61.
- (12) Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Jiang Y et al. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell Transplant*. 2003;12:201-213.
- (13) Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:101-117.
- (14) Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262:509-525.
- (15) Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110:3499-3506.
- (16) Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105:2821-2827.
- (17) Jiang XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105:4120-4126.
- (18) Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24:74-85.
- (19) Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009;11:503-515.

- (20) Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol.* 2008;36:733-741.
- (21) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-1441.
- (22) Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells.* 2006;24:2582-2591.
- (23) Inoue S, Popp FC, Koehl GE et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation.* 2006;81:1589-1595.
- (24) Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006;108:2114-2120.
- (25) Poncelet AJ, Vercruyse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation.* 2007;83:783-790.
- (26) Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8932-8937.
- (27) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.
- (28) Bittira B, Kuang JQ, Al Khaldi A, Shum-Tim D, Chiu RC. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg.* 2002;74:1154-1159.
- (29) Tomita S, Li RK, Weisel RD et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999;100:II247-II256.
- (30) Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood.* 2001;98:2008-2013.
- (31) McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1341-1346.
- (32) Wadman M. Cloning special: Dolly: a decade on. *Nature.* 2007;445:800-801.
- (33) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-49.
- (34) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-776.
- (35) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12313-12318.
- (36) Urbanek K, Quaini F, Tasca G et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10440-10445.
- (37) Kucia M, Dawn B, Hunt G et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;95:1191-1199.
- (38) Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004;94:1543-1553.

- (39) Kofidis T, Lebl DR, Martinez EC et al. Novel injectable bioartificial tissue facilitates targeted, less invasive, large-scale tissue restoration on the beating heart after myocardial injury. *Circulation*. 2005;112:1173-1177.
- (40) Kutschka I, Chen IY, Kofidis T et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation*. 2006;114:1167-1173.
- (41) Collins JM, Russell B. Stem cell therapy for cardiac repair. *J Cardiovasc Nurs*. 2009;24:93-97.
- (42) Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e20.
- (43) Hagege AA, Carrion C, Menasche P et al. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;361:491-492.
- (44) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280.
- (45) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001;108:407-414.
- (46) Min JY, Yang Y, Converso KL et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol*. 2002;92:288-296.
- (47) Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res*. 2003;58:324-335.
- (48) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2010;6:227-237.
- (49) Heng BC, Haider HK, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res*. 2004;62:34-42.
- (50) Marin-Garcia J, Goldenthal MJ. Application of stem cells in cardiology: where we are and where we are going. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006;1:1-11.
- (51) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107:1395-1402.
- (52) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705.
- (53) Norol F, Bonnet N, Peinnequin A et al. GFP-transduced CD34+ and Lin-. *Exp Hematol*. 2007;35:653-661.
- (54) Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M et al. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1572-1579.
- (55) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105:93-98.
- (56) Fazel S, Chen L, Weisel RD et al. Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1310.
- (57) Iso Y, Spees JL, Serrano C et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354:700-706.
- (58) Mangi AA, Noiseux N, Kong D et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003;9:1195-1201.

- (59) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12:459-465.
- (60) Simpson D, Liu H, Fan TH, Nerem R, Dudley SC, Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells.* 2007;25:2350-2357.
- (61) Chang SA, Kang HJ, Lee HY et al. Peripheral blood stem cell mobilisation by granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute and old myocardial infarction for intracoronary cell infusion. *Heart.* 2009;95:1326-1330.
- (62) Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106:3009-3017.
- (63) Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J et al. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007;100:1234-1241.
- (64) Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;95:742-748.
- (65) Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M et al. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J.* 2006;27:929-935.
- (66) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106:1913-1918.
- (67) Kim KS, Jin J, Lee YY et al. The timing of intra-coronary infusion of G-CSF mobilized peripheral blood stem cells influences cardiac function and in-stent restenosis in patients with myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2009.
- (68) Potapova I, Plotnikov A, Lu Z et al. Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res.* 2004;94:952-959.
- (69) Zhang M, Mal N, Kiedrowski M et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J.* 2007;21:3197-3207.
- (70) Askari A, Unzek S, Goldman CK et al. Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in improved left ventricular function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1908-1914.
- (71) Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation.* 2005;112:1178-1183.
- (72) Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-1209.
- (73) Janssens S, Dubois C, Bogaert J et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367:1113-1121.
- (74) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J.* 2006;27:2775-2783.
- (75) Chen SL, Fang WW, Ye F et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:92-95.

- (76) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 2004;363:751-756.
- (77) Kang HJ, Lee HY, Na SH et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation*. 2006;114:I145-I151.
- (78) Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361:45-46.
- (79) Dohmann HF, Perin EC, Takiya CM et al. Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomicopathologic and immunohistochemical findings. *Circulation*. 2005;112:521-526.
- (80) Tse HF, Kwong YL, Chan JK et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361:47-49.
- (81) Li TS, Hamano K, Hirata K, Kobayashi T, Nishida M. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J Card Surg*. 2003;18 Suppl 2:S69-S75.
- (82) Galinanes M, Loubani M, Davies J et al. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant*. 2004;13:7-13.
- (83) Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005;65:321-329.
- (84) Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25:342-350.
- (85) Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S et al. Intra-coronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol*. 2006;109:21-27.
- (86) Pompilio G, Cannata A, Peccatori F et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg*. 2004;78:1808-1812.
- (87) Fuchs S, Kornowski R, Weisz G et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006;97:823-829.
- (88) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1651-1658.
- (89) Erbs S, Linke A, Adams V et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res*. 2005;97:756-762.
- (90) Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I et al. Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;419-437.
- (91) Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 2003;102:1249-1253.
- (92) Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64:1-8.

- (93) Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 2003;121:368-374.
- (94) Levesque JP, Winkler IG, Larsen SR, Rasko JE. Mobilization of bone marrow-derived progenitors. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;3-36.
- (95) Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP et al. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood.* 2002;99:2037-2044.
- (96) Wright DE, Cheshier SH, Wagers AJ et al. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle. *Blood.* 2001;97:2278-2285.
- (97) Bonsignore MR, Morici G, Santoro A et al. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *J Appl Physiol.* 2002;93:1691-1697.
- (98) Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:285-292.
- (99) Pelus LM, Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia.* 2008;22:466-473.
- (100) Watari K, Asano S, Shirafuji N et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood.* 1989;73:117-122.
- (101) Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood.* 1990;76:1962-1964.
- (102) Takano H, Qin Y, Hasegawa H et al. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med.* 2006;84:185-193.
- (103) Stroncek D, Shawker T, Follmann D, Leitman SF. G-CSF-induced spleen size changes in peripheral blood progenitor cell donors. *Transfusion.* 2003;43:609-613.
- (104) Kurdi M, Booz GW. G-CSF-based stem cell therapy for the heart--unresolved issues part B: Stem cells, engraftment, transdifferentiation, and bioengineering. *Congest Heart Fail.* 2007;13:347-351.
- (105) McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE et al. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;89:65-71.
- (106) Bussolino F, Wang JM, Defilippi P et al. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature.* 1989;337:471-473.
- (107) Lee M, Aoki M, Kondo T et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2535-2541.
- (108) Schneider A, Kruger C, Steigleder T et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:2083-2098.
- (109) Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors.* 2005;23:33-41.
- (110) Harada M, Qin Y, Takano H et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.* 2005;11:305-311.
- (111) Korblyng M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood.* 2001;98:2900-2908.

- (112) Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC. Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood*. 2000;95:3025-3031.
- (113) Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:9374-9378.
- (114) Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 2001;98:1289-1297.
- (115) Peled A, Petit I, Kollet O et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999;283:845-848.
- (116) Rettig MP, Ramirez P, Nervi B, DiPersio JF. CXCR4 and mobilization of hematopoietic precursors. *Methods Enzymol*. 2009;460:57-90.
- (117) Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S et al. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97:799-804.
- (118) Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3:687-694.
- (119) Peled A, Kollet O, Ponomaryov T et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000;95:3289-3296.
- (120) Fibbe WE, Pruijt JF, Velders GA et al. Biology of IL-8-induced stem cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:71-82.
- (121) Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res*. 2003;18:1404-1418.
- (122) Heissig B, Hattori K, Dias S et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637.
- (123) Kovacic JC, Muller DW, Graham RM. Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:19-33.
- (124) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346:5-15.
- (125) Deb A, Wang S, Skelding KA et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*. 2003;107:1247-1249.
- (126) Rezai N, Deisher TA, Heine HL et al. Effects of granulocyte-colony stimulating factor on bone marrow-derived progenitor cells in murine cardiac transplantation. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:36-47.
- (127) Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH et al. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2007;73:783-793.
- (128) Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R et al. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med*. 2006;203:87-97.
- (129) Kurdi M, Booz GW. Can the protective actions of JAK-STAT in the heart be exploited therapeutically? Parsing the regulation of interleukin-6-type cytokine signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:126-141.
- (130) Li Y, Takemura G, Okada H et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest*. 2006;86:32-44.

- (131) Li Y, Fukuda N, Yokoyama S et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;549:98-106.
- (132) Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood.* 2000;95:270-276.
- (133) Bussolino F, Ziche M, Wang JM et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest.* 1991;87:986-995.
- (134) Misao Y, Takemura G, Arai M et al. Importance of recruitment of bone marrow-derived CXCR4+ cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF. *Cardiovasc Res.* 2006;71:455-465.
- (135) Massa M, Rosti V, Ferrario M et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005;105:199-206.
- (136) Tse HF, Lau CP. Therapeutic angiogenesis with bone marrow--derived stem cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2007;12:89-97.
- (137) Ballard VL, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ Res.* 2007;100:1116-1127.
- (138) Liao R, Pfister O, Jain M, Mouquet F. The bone marrow--cardiac axis of myocardial regeneration. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;50:18-30.
- (139) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428:668-673.
- (140) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428:664-668.
- (141) Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood.* 2005;105:526-532.
- (142) Roberts N, Xiao Q, Weir G, Xu Q, Jahangiri M. Endothelial progenitor cells are mobilized after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:598-605.
- (143) Sun Y, Yi D, Wang Y et al. Age-dependent mobilization of circulating endothelial progenitor cells in infants and young children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Cytokine.* 2009;47:206-213.
- (144) Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases. *Cell Transplant.* 2007;16:273-284.
- (145) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004;109:1543-1549.
- (146) Urbich C, Aicher A, Heeschen C et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:733-742.
- (147) Deindl E, Zaruba MM, Brunner S et al. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J.* 2006;20:956-958.
- (148) Heeschen C, Lehmann R, Honold J et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004;109:1615-1622.
- (149) Walter DH, Haendeler J, Reinhold J et al. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2005;97:1142-1151.

- (150) Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*. 2006;92:768-774.
- (151) Ohnishi S, Nagaya N. Prepare cells to repair the heart: mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Am J Nephrol*. 2007;27:301-307.
- (152) Wang XJ, Li QP. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359:189-193.
- (153) Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S21-S26.
- (154) Herbert KE, Walkley CR, Winkler IG et al. Granulocyte colony-stimulating factor and an RARalpha specific agonist, VTP195183, synergize to enhance the mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Transplantation*. 2007;83:375-384.
- (155) Misao Y, Arai M, Ohno T et al. Modification of post-myocardial infarction granulocyte-colony stimulating factor therapy with myelo-suppressives. *Circ J*. 2007;71:580-590.
- (156) Cho HJ, Yoon YS. Synergism of hematopoietic cytokines for infarct repair. *Circ Res*. 2006;98:990-992.
- (157) Dawn B, Guo Y, Rezaadeh A et al. Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function. *Circ Res*. 2006;98:1098-1105.
- (158) Askari AT, Unzek S, Popovic ZB et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703.
- (159) Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198:1391-1402.
- (160) Abbott JD, Huang Y, Liu D et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110:3300-3305.
- (161) Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*. 2002;99:394.
- (162) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10344-10349.
- (163) Ohtsuka M, Takano H, Zou Y et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J*. 2004;18:851-853.
- (164) Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation*. 2004;109:2572-2580.
- (165) Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005;65:446-456.
- (166) Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner RA. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1662-1669.
- (167) Kawada H, Fujita J, Kinjo K et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004;104:3581-3587.
- (168) Brunner S, Huber BC, Fischer R et al. G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells. *Exp Hematol*. 2008;36:695-702.

- (169) Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:1353-1359.
- (170) Norol F, Merlet P, Isnard R et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood.* 2003;102:4361-4368.
- (171) Deten A, Volz HC, Clamors S et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res.* 2005;65:52-63.
- (172) Higuchi T, Yamauchi-Takahara K, Matsumiya G et al. Granulocyte colony-stimulating factor prevents reperfusion injury after heart preservation. *Ann Thorac Surg.* 2008;85:1367-1373.
- (173) Hill JM, Syed MA, Arai AE et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1643-1648.
- (174) Kong D, Melo LG, Gneocchi M et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation.* 2004;110:2039-2046.
- (175) Cho HJ, Kim TY, Cho HJ et al. The effect of stem cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus paclitaxel-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:366-374.
- (176) Hasegawa H, Takano H, Ohtsuka M et al. G-CSF prevents the progression of atherosclerosis and neointimal formation in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:370-376.
- (177) Kang S, Yang Y, Li CJ, Gao R. Effectiveness and tolerability of administration of granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Ther.* 2007;29:2406-2418.
- (178) Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J.* 2005;26:1838-1845.
- (179) Ince H, Petzsch M, Kleine HD et al. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation.* 2005;112:3097-3106.
- (180) Takano H, Hasegawa H, Kuwabara Y et al. Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2007;122:41-47.
- (181) Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295:1003-1010.
- (182) Overgaard M, Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E, Kastrup J. Timing of granulocyte-colony stimulating factor treatment after acute myocardial infarction and recovery of left ventricular function: Results from the STEMMI trial. *Int J Cardiol.* 2009.
- (183) Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2006;113:1983-1992.
- (184) Stein A, Zohnhofer D, Pogatsa-Murray G et al. Expression of CXCR4, VLA-1, LFA-3 and transducer of ERB in G-CSF-mobilised progenitor cells in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2010;103:638-643.
- (185) Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1712-1721.

- (186) Engelmann MG, Theiss HD, Theiss C et al. G-CSF in patients suffering from late revascularised ST elevation myocardial infarction: Final 1-year-results of the G-CSF-STEMI Trial. *Int J Cardiol.* 2009.
- (187) Lehrke S, Mazhari R, Durand DJ et al. Aging impairs the beneficial effect of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor on post-myocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2006;99:553-560.
- (188) Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK et al. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J.* 2008;156:216-226.
- (189) Ellis SG, Penn MS, Bolwell B et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial. *Am Heart J.* 2006;152:1051-14.
- (190) Zohnhofer D, Kastrati A, Schomig A. Stem cell mobilization by granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction: lessons from the REVIVAL-2 trial. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4 Suppl 1:S106-S109.
- (191) Leone AM, Galiuto L, Rutella S et al. Safety of granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction (the Rigenere study). *Heart.* 2006;92:1850-1851.
- (192) Leone AM, Galiuto L, Garramone B et al. Usefulness of granulocyte colony-stimulating factor in patients with a large anterior wall acute myocardial infarction to prevent left ventricular remodeling (the rigenera study). *Am J Cardiol.* 2007;100:397-403.
- (193) Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB et al. Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002;15:601-609.
- (194) Gan LM, Gronros J, Hagg U et al. Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy. *Atherosclerosis.* 2007;190:313-320.
- (195) Xu Q, Ming Z, Dart AM, Du XJ. Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:499-507.
- (196) Kovacs A. *Echocardiographie clinique.* Masson. 1-7-0006.
- (197) Abergel CGR. *Echocardiographie clinique de l'adulte Volume1. ESTEM.* 2003.
- (198) Thibault H, Gomez L, Donal E et al. Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmuralty by strain rate imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H496-H502.
- (199) Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* 2008;3:1422-1434.
- (200) Walrand S, Jamar F, de Jong M, Pauwels S. Evaluation of novel whole-body high-resolution rodent SPECT (Linoview) based on direct acquisition of linogram projections. *J Nucl Med.* 2005;46:1872-1880.
- (201) Germano G, Kavanagh PB, Waechter P et al. A new algorithm for the quantitation of myocardial perfusion SPECT. I: technical principles and reproducibility. *J Nucl Med.* 2000;41:712-719.
- (202) Germano G, Kavanagh PB, Slomka PJ et al. Quantitation in gated perfusion SPECT imaging: the Cedars-Sinai approach. *J Nucl Cardiol.* 2007;14:433-454.
- (203) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
- (204) Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;106:984-991.

- (205) Muller I, Kordowich S, Holzwarth C et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*. 2006;8:437-444.
- (206) Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625.
- (207) Peister A, Mellad JA, Larson BL et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004;103:1662-1668.
- (208) Norol F, Drouet M, Mathieu J et al. Ex vivo expanded mobilized peripheral blood CD34+ cells accelerate haematological recovery in a baboon model of autologous transplantation. *Br J Haematol*. 2000;109:162-172.
- (209) Drouet M, Herodin F, Norol F, Mourcin F, Mayol JF. Cell cycle activation of peripheral blood stem and progenitor cells expanded ex vivo with SCF, FLT-3 ligand, TPO, and IL-3 results in accelerated granulocyte recovery in a baboon model of autologous transplantation but G0/G1 and S/G2/M graft cell content does not correlate with transplantability. *Stem Cells*. 2001;19:436-442.
- (210) Giet O, Huygen S, Beguin Y, Gothot A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitor cells increases very late antigen-5-mediated adhesion to fibronectin. *Exp Hematol*. 2001;29:515-524.
- (211) Giet O, Van Bockstaele DR, Di S, I et al. Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2002;99:2023-2031.
- (212) Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood*. 1998;92:2641-2649.
- (213) Huygen S, Giet O, Artisien V et al. Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture. *Blood*. 2002;100:2744-2752.
- (214) Fukuda K. Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32 Suppl 1:S25-S27.
- (215) Shim WS, Jiang S, Wong P et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324:481-488.
- (216) Xu W, Zhang X, Qian H et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:623-631.
- (217) Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126:124-132.
- (218) Zhang FB, Li L, Fang B et al. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:784-792.
- (219) Overstraeten-Schlogel N, Delgaudine M, Beguin Y, Gothot A. Limitations of the use of GFP transgenic mice in bone marrow transplantation studies. *Leuk Lymphoma*. 2006;47:1392-1393.
- (220) Ambler SK, Hodges YK, Jones GM, Long CS, Horwitz LD. Prolonged administration of a dithiol antioxidant protects against ventricular remodeling due to ischemia-reperfusion in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1303-H1310.
- (221) Shioura KM, Geenen DL, Goldspink PH. Sex-related changes in cardiac function following myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R528-R534.
- (222) Zhang Q, Saito Y, Naya N et al. The specific mineralocorticoid receptor blocker eplerenone attenuates left ventricular remodeling in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Hypertens Res*. 2008;31:1251-1256.

- (223) Pons S, Fornes P, Hagege AA et al. Survival, haemodynamics and cardiac remodelling follow up in mice after myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:25-31.
- (224) Kanno S, Kovacs A, Yamada KA, Saffitz JE. Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:681-686.
- (225) Scherrer-Crosbie M, Thibault HB. Echocardiography in translational research: of mice and men. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008;21:1083-1092.
- (226) Rottman JN, Ni G, Brown M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. *Echocardiography.* 2007;24:83-89.
- (227) Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH et al. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol.* 1998;274:H1416-H1422.
- (228) Chiang KY, Lamb L, Clark J et al. Assessment of G-CSF stimulated BM hematopoietic stem cells in normal donors. *Cytotherapy.* 2002;4:55-63.
- (229) Foguene J, Huygen S, Greimers R, Beguin Y, Gothot A. Modulation of homing properties of primitive progenitor cells generated by ex vivo expansion. *Haematologica.* 2005;90:445-451.
- (230) Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, Wengner AM, Rankin SM. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell.* 2009;4:62-72.
- (231) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-958.
- (232) Rohde E, Bartmann C, Schallmoser K et al. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells.* 2007;25:1746-1752.
- (233) Mansilla E, Marin GH, Drago H et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc.* 2006;38:967-969.
- (234) Tondreau T, Meuleman N, Delforge A et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005;23:1105-1112.
- (235) Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2:477-488.
- (236) Kassis I, Zangi L, Rivkin R et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:967-976.
- (237) Tatsumi K, Otani H, Sato D et al. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J.* 2008;72:1351-1358.
- (238) Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica.* 2008;93:908-912.
- (239) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-E7.
- (240) Cho HJ, Kim HS, Lee MM et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation.* 2003;108:2918-2925.
- (241) Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood.* 2004;103:921-926.

- (242) Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116:1195-1201.
- (243) Fibbe WE, Hamilton MS, Laterveer LL et al. Sustained engraftment of mice transplanted with IL-1-primed blood-derived stem cells. *J Immunol*. 1992;148:417-421.
- (244) Bungart B, Loeffler M, Goris H et al. Differential effects of recombinant human colony stimulating factor (rh G-CSF) on stem cells in marrow, spleen and peripheral blood in mice. *Br J Haematol*. 1990;76:174-179.
- (245) de Kruijf EJ, van Pel M, Hagoort H et al. Repeated hematopoietic stem and progenitor cell mobilization without depletion of the bone marrow stem and progenitor cell pool in mice after repeated administration of recombinant murine G-CSF. *Hum Immunol*. 2007;68:368-374.
- (246) Molineux G, Pojda Z, Dexter TM. A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1990;75:563-569.
- (247) Cheng T, Rodrigues N, Shen H et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000;287:1804-1808.
- (248) Ai G, Su Y, Yan G et al. [The experimental study of bone marrow mesenchymal stem cells on the repair of skin wound combined with local radiation injury]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2002;82:1632-1636.
- (249) Lee CH, Moiola EK, Mao JJ. Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;1:775-778.
- (250) Barcew K, Paczkowska E, Dabkowska E et al. The effect of stem cell mobilisation with granulocyte colony-stimulating factor on the morphology of the haematopoietic organs in mice. *Folia Morphol (Warsz)*. 2007;66:1-9.
- (251) Case J, Mead LE, Bessler WK et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 2007;35:1109-1118.
- (252) Smith PJ, Blunt N, Wiltshire M et al. Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry*. 2000;40:280-291.
- (253) Yuan CM, Douglas-Nikitin VK, Ahrens KP et al. DRAQ5-based DNA content analysis of hematolymphoid cell subpopulations discriminated by surface antigens and light scatter properties. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;58:47-52.
- (254) Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE et al. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2007;562:111-118.
- (255) Ingram DA, Mead LE, Tanaka H et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760.
- (256) Werner N, Kosiol S, Schiegl T et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353:999-1007.
- (257) Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;110:3213-3220.
- (258) Brehm M, Ebner P, Picard F et al. Enhanced mobilization of CD34(+) progenitor cells expressing cell adhesion molecules in patients with STEMI. *Clin Res Cardiol*. 2009;98:477-486.
- (259) Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol*. 2004;32:502-509.

- (260) Wang Y, Ripa RS, Jorgensen E et al. Mobilization of haematopoietic and non-haematopoietic cells by granulocyte-colony stimulating factor and vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with stable severe coronary artery disease. *Scand Cardiovasc J.* 2007;1-8.
- (261) Ripa RS, Haack-Sorensen M, Wang Y et al. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2007;116:124-130.
- (262) Dai Y, Ashraf M, Zuo S et al. Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:607-617.
- (263) Yoder MC, Mead LE, Prater D et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* 2007;109:1801-1809.
- (264) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-436.
- (265) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5:434-438.
- (266) Fujita J, Mori M, Kawada H et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. *Stem Cells.* 2007;25:2750-2759.
- (267) Kanellakis P, Slater NJ, Du XJ, Bobik A, Curtis DJ. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2006;70:117-125.
- (268) Ieishi K, Nomura M, Kawano T et al. The effect of G-CSF in a myocardial ischemia reperfusion model rat. *J Med Invest.* 2007;54:177-183.
- (269) Louzada RA, Oliveira PF, Cavalcanti-de-Albuquerque JP et al. Granulocyte-colony Stimulating Factor Treatment of Chronic Myocardial Infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010.
- (270) Edmonds M, Bates M, Doxford M, Gough A, Foster A. New treatments in ulcer healing and wound infection. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16 Suppl 1:S51-S54.
- (271) Gough A, Clapperton M, Rolando N et al. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet.* 1997;350:855-859.
- (272) Takahama H, Minamino T, Hirata A et al. Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006;20:159-165.
- (273) Ueda K, Takano H, Hasegawa H et al. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:e108-e113.
- (274) Lee SS, Naqvi TZ, Forrester J et al. The effect of granulocyte colony stimulating factor on regional and global myocardial function in the porcine infarct model. *Int J Cardiol.* 2007;116:225-230.
- (275) Lee TM, Chen CC, Chang NC. Granulocyte colony-stimulating factor increases sympathetic reinnervation and the arrhythmogenic response to programmed electrical stimulation after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H512-H522.
- (276) Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood.* 2004;103:1580-1585.
- (277) Mineur P, Colige AC, Deroanne CF et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol.* 2007;179:1261-1273.

- (278) Yoon YS, Johnson IA, Park JS, Diaz L, Losordo DW. Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Mol Cell Biochem.* 2004;264:63-74.
- (279) Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1015-1026.
- (280) Wagner W, Feldmann RE, Jr., Seckinger A et al. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol.* 2006;34:536-548.
- (281) Lee OK, Kuo TK, Chen WM et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004;103:1669-1675.
- (282) Young RG, Butler DL, Weber W et al. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 1998;16:406-413.
- (283) Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80:1745-1757.
- (284) Zhao LR, Duan WM, Reyes M et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002;174:11-20.
- (285) Spees JL, Olson SD, Ylostalo J et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2397-2402.
- (286) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279:1528-1530.
- (287) Powell TM, Paul JD, Hill JM et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:296-301.
- (288) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103:2776-2779.
- (289) Yang F, Liu YH, Yang XP et al. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.* 2002;87:547-555.
- (290) Ma J, Ge J, Zhang S et al. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:217-223.
- (291) Roberts AW, Foote S, Alexander WS et al. Genetic influences determining progenitor cell mobilization and leukocytosis induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1997;89:2736-2744.
- (292) Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell.* 2008;3:364-366.

Annexes

1. PUBLICATIONS

- Limitations of the use of GFP transgenic mice in bone marrow transplantation studies.
Van Overstraeten-Schlögel N, **Delgaudine M**, Beguin Y, Gothot A.
Leuk Lymphoma. 2006 Jul;47(7):1392-3.
- Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Josse C, Schoemans R, Niessen NA, **Delgaudine M**, Hellin AC, Herens C, Delvenne P, Bours V.
Stem Cells Dev. 2010 Jan 28.
- Spontaneous and granulocyte-colony-stimulating factor-enhanced marrow response and progenitor cell mobilization in mice after myocardial infarction.
Delgaudine M, Gothot A, Beguin Y.
Cytotherapy. 2010 Mar 15.
- Effects of G-CSF on progenitor cell mobilization and heart perfusion and function in normal mice
Marie Delgaudine, Bernard Lambermont, Patrizio Lancellotti, Véronique Roelants , Stéphan Walrand, Jean-Louis Vanovershelde, Luc Pierard, André Gothot, Yves Beguin
Cytotherapy. 2010 Mei 15.

2. ABSTRACTS ET CONFERENCES : PRESENTATIONS ORALES

- G-CSF mobilization of haematopoietic and mesenchymal stem cells and their contribution to cardiac repair after myocardial infarction in mice.
Marie Delgaudine, André Gothot, Yves Beguin.
Belgian Hematology Society, 2008, Oostende
- Evaluation of the Novel High-Resolution Rodent Linoview SPECT for Myocardial Perfusion Imaging of Mice
V. Roelants, **M. Delgaudine**, L. de Leval, Y. Beguin, J. Vanovershelde, F. Jamar, S. Walrand
Société Belge de Médecine Nucléaire, mai 2007, Spa
- VEGF111, a new VEGF-A isoform induced by genotoxix agents resistance to proteolytic degradation and effect on heart ischemia after infarction in mice
Pierre Mineur, **Marie Delgaudine**, Alain C Colige, Christophe Deroanne, Frederic Kesteloot, Johanne Dubail, André Gothot, Charles M Lapière, A. Noël, Stefan Vöö, Johannes Waltenberger, Betty V Nusgens and Charles A Lambert
Molecular Mechanism of Angiogenesis in Development and Disease, janvier 2008, Vancouver, Canada

3. ABSTRACTS ET CONFERENCES : PRESENTATION D'UN POSTER

- Cellular therapy for cardiac tissue repair by haematopoietic and mesenchymal stem cells.
Marie Delgaudine, André Gothot, Philippe Delvenne, Yves Beguin
Belgian Hematology Society, 2006, Geneval
- Isolation, characterisation and differentiation of mesenchymal stem cells for cardiac tissue repair.
Marie Delgaudine, André Gothot, Yves Beguin
European School of Haematology 2006, Cannes

- G-CSF mobilization of haematopoietic and mesenchymal stem cells and their contribution to cardiac repair after myocardial infarction in mice.
Marie Delgaudine, André Gothot, Yves Beguin
European School of Haematology 2006, Cannes
- G-CSF mobilization of haematopoietic and mesenchymal stem cells and their contribution to cardiac repair after myocardial infarction in mice.
Marie Delgaudine, André Gothot, Yves Beguin
Belgian Hematology Society, 2007, Geneva
- Evaluation of the Novel High-Resolution Rodent Linoview SPECT for Myocardial Perfusion Imaging of Mice
V. Roelants, **M. Delgaudine**, L. de Leval, Y. Beguin, J. Vanovershelde, F. Jamar, S. Walrand
Molecular Imaging Conference, septembre 2007, Rhode Island USA
- G-CSF mobilization of haematopoietic and mesenchymal stem cells and their contribution to cardiac repair after myocardial infarction in mice.
Marie Delgaudine, Valérie Henrard, Bernard Lambermont, Véronique Roelants, Patrizio Lancellotti, Luc Pierard, André Gothot, Yves Beguin
International Society for Cellular Therapy, septembre 2008, Anvers

LETTER TO THE EDITOR

Limitations of the use of GFP transgenic mice in bone marrow transplantation studies

NANCY VAN OVERSTRAETEN-SCHLÖGEL, MARIE DELGAUDINE, YVES BEGUIN, & ANDRÉ GOTHOT

Departments of Medicine/Hematology and Laboratory Medicine, University Hospital of Liège, Belgium

Numerous transplantation studies used enhanced green fluorescent protein (GFP) transgenic mice (C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J, strain 003291, the Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) for tracking the fate of exogenous murine cells [1–4]. In this strain, GFP cDNA is inserted under the control of a chicken β -actin promoter, a cytomegalovirus enhancer and bovine globin polyadenylation signal. GFP fluorescence is assumed to be uniformly expressed in all tissues with the exception of erythrocytes and hair [5]. Here, we demonstrate that GFP expression is variable in hematopoietic cells, maximal in primitive stem/progenitor cells and gradually lost with differentiation.

First, we collected bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of GFP mice. After hemolysis, the proportion of GFP⁺ cells was assessed by flow cytometry in phenotypically-defined populations of primitive and differentiated cells (Table I). In the BM, GFP expression was predominant in primitive Sca-1⁺ ckit⁺ lin⁻ stem/progenitor cells and declined in Sca-1⁺ ckit⁺ lin⁺ committed progenitors ($P=0.014$). In the PB, the overall GFP expression was lower than in the BM. When present, GFP fluorescence was of similar intensity in all cell lineages examined contrarily to what has been reported in other strains of GFP transgenic mice in which T cells have a 2-fold higher GFP expression than B cells (strain 004353, Jackson Laboratory).

We then evaluated the presence of functional clonogenic GFP⁺ progenitors. BM cells were seeded in a standard semi-solid medium (M3434, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Among

238 \pm 15 hematopoietic colonies (10^4 bone marrow cells seeded, $n=4$), only 81 \pm 5 (34% of total colonies) were GFP⁺ when examined in fluorescence microscopy.

The lower proportion of GFP⁺ cells in mature cell fractions could result from an increased apoptosis rate of GFP⁺ primitive stem/progenitors and a subsequent enrichment of differentiated cells generated from GFP⁻ stem/progenitor cells. Alternatively, GFP⁺ stem/progenitors could lose GFP expression along with multiplication and differentiation. To assess the apoptotic rate, sca-1⁺ ckit⁺ lin⁻ cells isolated from GFP and wild-type mice were subjected to annexin V/propidium iodide FACS analysis. GFP⁺ sca-1⁺ ckit⁺ lin⁻ cells did not present a significant higher apoptotic rate ($2.2 \pm 1.1\%$) than wild-type sca-1⁺ ckit⁺ lin⁻ cells ($1.6 \pm 0.69\%$, $n=3$). To test the second hypothesis, we performed in vitro cell tracking experiments of GFP⁺ sca-1⁺ ckit⁺ lin⁻ cells. Cells were labeled with PKH26 (Sigma, St-Louis, MO) and seeded in suspension culture with cytokines mSCF, mFlt3L, mIL3, mIL6 and mG-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) for 3 days, after which retention of PKH26 staining and GFP expression were analyzed by FACS (Figure 1). After culture, GFP expression was present in a minor population (6.9%), while the majority of cells were GFP negative after the execution of a variable number of cell divisions. Interestingly, GFP fluorescence intensity was either present or totally absent, suggesting a complete suppression of transgene expression in most dividing cells rather than a gradual increase in GFP degradation.

Correspondence: André Gothot, M.D., Laboratory Hematology, CHU Sart Tilman B35 13, avenue de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium. Tel: 32 4 366 82 20. Fax: 32 4 366 73 94. E-mail: agothot@ulg.ac.be

Accepted 22 November 2005.

ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403 online © 2006 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/10428190500513512

2 Letter to the Editor

Table I. Distribution of GFP expression in hematopoietic cells.

Cell fraction	% GFP ⁺ cells
<i>Bone marrow</i>	
Sca-1 ⁺ ckit ⁺ lin ⁻ cells	84.6 ± 3.6
Sca-1 ⁺ ckit ⁺ lin ⁺ cells	64.9 ± 9.1
<i>Peripheral blood</i>	
CD5 (Ly-1) ⁺	46.1 ± 9.9
CD45R/B220 ⁺	32.7 ± 4.6
Gr (Ly-6G) ⁺	36.2 ± 2.2
CD11b/Mac-1 ⁺	36.0 ± 1.7
Total	37.8 ± 2.9

GFP expression was measured in combination with indicated phenotypic markers ($n=5$).

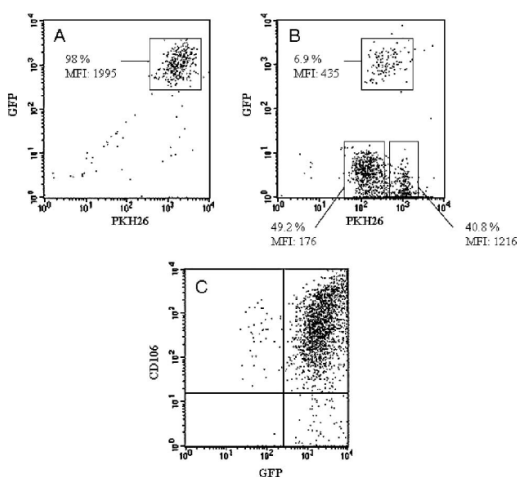


Figure 1. Stability of GFP expression in hematopoietic progenitors and MSC cultured ex vivo. (A) GFP⁺ sca-1⁺ ckit⁺ lin⁻ cells were sorted and labeled with PKH26. Uncultured stained cells were saved as control of baseline fluorescence. (B) GFP expression and PKH26 staining after 3 days in culture. Medium consisted of α -MEM, 10% FBS, 10 ng/ml each of IL-3, IL-6, SCF, and G-CSF. Mean PKH26 fluorescence intensity (MFI) and percentage of distinct cell clusters are indicated. (C) GFP expression by CD106⁺ MSC after 7 passages.

In contrast, GFP expression was conserved in ex vivo-amplified BM mesenchymal stem cells (MSC). Indeed, a progressive increase in the proportion of GFP-expressing cells was observed during culture of BM mononuclear cells in DMEM plus 10% fetal bovine serum: % GFP⁺ cells was 33.4 ± 4.0 cells at culture initiation to reach $>95\%$ after 7 passages. This was correlated with the emergence of a phenotypically pure population of CD106⁺ Sca-1⁺ CD45⁻ CD11b⁻ MSCs, retaining osteocytic, adipocytic and chondrocytic differentiation capacity in adequate induction mediums [6].

In conclusion, we show that in this transgenic GFP-expressing mouse strain, transgene expression is stable in MSCs but not in hematopoietic cells. Indeed, while present in the large majority of primitive stem/progenitor cells, GFP is absent in a sizeable fraction of BM committed progenitors and PB differentiated leucocytes. Our data support the hypothesis that GFP expression is lost upon cell division and differentiation. If used as reporter gene in transplantation experiments of BM cells, measure of GFP expression in recipients could vastly underestimate the cell output of hematopoietic origin while the generation of MSC-derived cells would be correctly determined. The elucidation of molecular mechanisms underlying the observed differences in transgene expression between these two cell lineages requires further investigation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S., Brussels, Belgium), the University of Liège Center against Cancer and the Belgian Federation against Cancer (a non-profit organization). N.V.O. was supported by a Télévie fellowship. M.D. is a fellow of the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (F.R.I.A.). Y.B. and A.G. are Research Director and Research Associate, respectively, of the F.N.R.S.

References

1. Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *Journal of Biochemistry* 2003;134:551–558.
2. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16489–16494.
3. Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martínez-Marín JA, de Andres B, Salas C, et al. A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003;112:1152–1163.
4. Rubart M, Soonpaa MH, Nakajima H, Field LJ. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* 2004;114:775–783.
5. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *Febs Letters* 1997;407:313–319.
6. Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 2004;103:1647–1652.

Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Claire Josse, Renaud Schoemans, Neville-Andrew Niessen, Marie Delgaudine, Anne-Cécile Hellin, Christian Herens, Philippe Delvenne and Vincent Bours.

Authors informations :

Claire Josse, Department of Human Genetics, GIGA I3, CHU, Liege University, Belgium.

c.josse@ulg.ac.be. Tel : +3243662474, Fax : +3243664534.

Renaud Schoemans, Department of Human Genetics, GIGA I3, CHU, Liege University, Belgium.

r.schoemans@ulg.ac.be. Tel : +3243662514, Fax : +3243664534.

Neville-Andrew Niessen, Department of Human Genetics, GIGA I3, CHU, Liege University, Belgium. NA.Niessen@ulg.ac.be. Tel : +3243665977, Fax : +3243665971.

Marie Delgaudine, Department of Haematology, GIGA I3, CHU, Liege University, Belgium.

marie.delgaudine@student.ulg.ac.be. Tel : +3243667596, Fax : +3261238100.

Anne-Cécile Hellin, Centre of Human Genetics, CHU Liège, Belgium. ac.hellin@chu.ulg.ac.be. . Tel : +3243662562, Fax : +3243662974.

Christian Herens, Centre of Human Genetics, CHU Liège, Belgium. Christian.Herens@chu.ulg.ac.be. Tel : +3243662560, Fax : +3243662974.

Philippe Delvenne, Anatomy and cytopathology Department, GIGA Cancer, CHU, Liège University, Belgium. p.delvenne@ulg.ac.be. Tel : +3243662564, Fax : +3243662919.

Corresponding author : Vincent Bours, Department of Human Genetics, Bat B35, CHU, 4000 Liège, Belgium. Tel : +3243668144, Fax : +3243668146, E-mail : vbours@chu.ulg.ac.be

Running Title : Systematic chromosomal alterations in murine BM-MSC.

Acknowledgments : The authors would like to thank Sandra Ormenese (GIGA-Imaging platform - Liege University, Belgium) for the Facs analysis and Yasmina Amkrane for her excellent technical assistance. We thank P. Roncarati and Dr A. Thiry for technical and scientific support.

Funding : This work was supported by a Waleo grant from the Region Wallonne.

Author Disclosure Statement : No competing financial interests exist

Key words : MSC, Genomics, Mutation

Suggested reviewers :

Thomas RIED, Genetics Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. E-mail : riedt@mail.nih.gov. Phone : 301-594-3118. Fax : 301-435-4428.

Ferdinando MANNELLO. Department of Biomolecular Sciences, Section of Clinical Biochemistry, University "Carlo Bo", I-61029 Urbino (PU), Italy. E-mail: ferdinando.mannello@uniurb. Fax: 39-0722-322370.

Philippe COLLAS, Institute of Basic Medical Sciences, Department of Biochemistry, University of Oslo, PO Box 1112 Blindern, 0317 Oslo, Norway. E-mail : phile@medisin.uio.no Phone : +47-22 85 10 66 Fax:+47 22 85 10 58

Jan VIJG, Department of Genetics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA. E-mail : jvijg@aecom.yu.edu. Phone.: +1 718 678 1151; fax: +1 718 430 8878.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are studied as a cellular source for the treatment of various diseases. In this work, we isolated and cultivated murine bone marrow-derived MSCs. After a first observation of a solid tumor in a mouse injected with these cells, we systematically explored their chromosomal stability. We observed in all the cytogenetically analysed cases gross chromosomal alterations every time the MSCs went through the senescence crisis while the lymphocytes from the same animals showed a normal chromosome count. This observation was confirmed in different mouse strains, with different culture protocols, and even in short-term cultures after an hematopoietic cell negative immunodepletion performed in order to accelerate the isolation procedure. Therefore, we conclude that murine MSCs display high chromosomal instability, can generate tumors, and that care must be taken before using them for the evaluation of MSC therapeutic potential.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) have an evident therapeutic potential as they possess self-renewal property, and have the capacity to differentiate under appropriate stimuli into specialised cells or tissues [1]. They are easy to obtain from different origins, to purify and to expand *ex vivo*. An always increasing body of research is undergone to use these cells as a therapy for a large variety of therapeutical applications such as tissue replacement [2-6], anti-cancer therapy [7, 8], immune modulation in graft-versus-host disease (GVHD) [9, 10] or as "trophic" mediators for therapeutic outcome [11].

However, the safety issue remains open. As MSCs have the ability to expand, one might wonder whether they may also be the seed for tumors. A few reports indicated spontaneous *ex vivo* transformation of these cells in mice [12, 13]. In contrast and quite fortunately, in humans, if this phenomenon exists, it seems to be an exceptional event occurring only after long term *ex vivo* culture [14-16].

Here we report that bone marrow-derived mouse mesenchymal stem cells invariably undergo chromosomal alterations during the *ex vivo* culture, even before complete purification. Such a genetic instability thus prevents the use of murine MSC in any animal model of cell therapy.

Design and Methods

Mouse Strains : BTBR-*Pah*^{enu2}/J mice BTBR-Pahenu2/were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA), BTBR *T⁺ tf/J* and C57BL/6J from Charles River Laboratories (Bruxelles, Belgium). All animal protocols were approved by the local ethical review board.

Genotyping :

Genetic characterization of BTBR-*Pah*^{enu2}/J animals was performed on DNA prepared from tail or tumor tissue using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium). The enu2 mutation introduce a BsmA1 restriction site in the exon 7 of the Pah gene. This mutation was detected after PCR amplification (Sense primer : 5'-TGCTTTCCAGCTTGACTGGTTTCC-3'; antisense primer : 5'-

GATCCATGCCTAATGTACTGTGTGC-3'; 30 cycles : 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C) and digestion with BsmA1 restriction enzyme, 2h at 55°C (New England Biolabs, Westburg, Leusden, The Netherlands). The digestion products were loaded on a 20% Acrylamide gel and visualized by U.V. illumination after ethidium bromide staining.

Morphological evaluation of the tumor : Five-micron frozen sections of the tumor specimen were stained with Hematoxylin Eosin Safran (HES).

MSC isolation and culture : If not otherwise stated, culture media components came from Lonza (Verviers, Belgium). All media were supplemented with penicilin/streptomycin 100 U/mL and L-Glutamine 2 mM except when using Mouse Mesencult Mesenchymal Stem Cell medium (Stem Cell Technologies, Grenoble, France).

The other media components used were : Horse serum and Perbio Hyclone Foetal Bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgium), Mouse Serum (Abcam, Cambridge, UK), HGF (hepatocyte growth factor) (Peprotec, London, UK), LIF (leukemia inhibitory factor) (mouse, Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium), EGF (epithelial growth factor) (human, Peprotec, London, U.K.). MSC purification was realised by adherence and passages until they were free from hematopoietic cells as assessed by flow cytometric analysis, or by immunodepletion as described below.

Bone marrow was collected by flushing mouse femurs and tibiae as described [17]. We tested different cell culture densities: in most cases, cells were maintained between 2.000 and 15.000 cells/cm².

Hematopoietic cell immunodepletion from MSC cultures. At passage 2, MSCs were incubated with biotinylated anti-mouse CD34 (Serotec, Oxford, UK), CD45 and CD11b antibodies (BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium). Afterwards, streptavidin-coated microbeads were added before loading on a MS separation column from Miltenyi Biotech (Utrecht, The Netherlands).

MSC injection in mice. 2 x 10⁶ MSCs were injected into the spleen of BTBR-*Pah*^{enu2}/J mice, which had previously undergone an hepatic lesion induced by two intraperitoneal administration of 45 mg/kg allyl alcohol (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium).

MSC differentiation into osteoblast, adipocytes and chondrocytes. Differentiation Media Bullekit-Osteogenic and Adipogenic from Lonza were used according to the manufacturer's instructions. Analysis was performed by measuring the Ca^{2+} deposition using the Calcium Stanbio Total Liquicolor kit (Medigal, Acoz-Laupsprelle, Belgium), or by staining the lipids with Oil Red O (Sigma-Aldrich Bornem, Belgium). Chondrocyte differentiation was realized by micromass culture of 5×10^5 MSCs in polypropylene tube for 21 days in the presence of chondrogenic differentiation medium composed of DMEM and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pyruvate (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgium), 500 ng/mL BMP-6 and 10 ng/mL TGF β 3 (Peprotec, London, UK), dexamethazone 10^{-7}M and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbate 2-phosphate and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proline and ITS + 1 premix (Sigma-Aldrich Bornem, Belgium). Negative differentiation control were realized by micromass culture by of 5×10^5 MSCs in polypropylene tube for 21 days in presence of DMEM and 10% FBS (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgium). MSC clumps were fixed with paraformaldehyde 4%, parafin embeded, and Toluidin blue stained.

Flow cytometry. 4×10^5 MSCs were incubated with primary antibodies against mouse CD45, CD106, CD34, CD11b, Ly6A/E (Sca-1) or CD90.2 (Thy1.2). The anti-CD11b and CD45 antibodies were PE labelled. The CD90.2 antibody was FITC labelled. Detection of CD106, CD34 and Sca-1 staining was performed with an APC-labelled secondary antibody. As negative controls, a PE-labelled immunoglobulin G isotype-matched control or FITC-labelled G isotype-matched control were used or the primary antibody was omitted. The antibodies were all from BD Pharmingen except for the CD90.2 antibody from eBioSciences (ImmunoSource, Halle-Zoersel, Belgium)

Analysis was performed on a BD FACSCalibur (BD Biosciences).

Metaphase spread. All media components were purchased from Gibco-Invitrogen. MSCs were seeded on glass slides and incubated for 4h with 100 ng/mL colcemid. Cells were incubated in hypotonic solution (0,9% NaCl) and fixed in methanol : acid acetic (3:1). 0,5 mL heparinized blood was placed in culture for 72h with 5 mL culture medium composed of RPMI, FBS 20%, PHA 3%, 100 U/mL Penicilin/Streptomycine. Blood cells were incubated for 1,5h with 100 ng/mL colcemid. Cells were then incubated in hypotonic solution (0.075M KCl), and fixed in methanol : acid acetic (3:1).

Results and Discussion

In the context of a cell therapy research project for phenylketonuria, we transfused bone marrow-derived MSCs, isolated from BTBR-*Pah*^{enu2}/J, in the spleen of syngeneic immunocompetent mice. Unexpectedly, five months later, one of the six transfused mice developed a solid tumor at the injection site. Because of the different status for the phenylalanine hydroxylase gene (*Pah*) of the MSC donor animal (*Pah* +/+) and the host mice (*Pah* -/-), we could genotype this tumor and confirm its donor origin.

HES-stained sections showed a tumor formed by malignant undifferentiated spindle cells focally organized in fascicles with elongated or pleomorphic nuclei and acidophilic poorly delineated cytoplasm (Figure 1). The degree of nuclear atypia was highly variable, as well as the mitotic activity and the degenerative changes. The histology was thus compatible with a sarcoma and there was not any evidence of mineralized bone, osteoid, cartilage formation or muscular differentiation within the tumor.

As it has been postulated that genome instability is critical for tumor formation [18], we performed metaphase spreading of the MSCs that have led to the tumor formation. All mitosis presented abnormal chromosomal count as depicted in Figure 2.

In order to obtain MSCs with normal karyotype, we compared different culture protocols. We tested several media such as RPMI, DMEM, DMEM/F12 or Murine Mesencult. We also used serum from different species (horse or mouse) in combination with foetal bovine serum (10% FBS, 20% FBS, 10% FBS + 10% horse serum, 10% FBS + 10% mouse serum). We added different growth factors such as HGF 20 ng/mL [19], LIF 20 ng/mL or EGF 20 ng/mL [20]. Moreover, we reduced the duration of the *ex vivo* culture by immunodepletion of the hematopoietic cells as recommended by Schrepfer and colleagues [19]. This operation was realised at passage 2 or 3. We also tested different cell densities. Most of the MSC cultures (around 70%) did not pass through the senescence and the crisis phases (~ 2-3 passages). But when the cells survived after the senescence and the crisis phases, we observed systematically that, independently of the culture medium used and of the realisation of an hematopoietic cell immunodepletion, they always presented an abnormal chromosome number. We already observed this phenomenon at passage 2~3, just after the senescence phase, 2 months after

isolation. As shown in Table 1, metaphase spreads of 20 different MSCs cultures were realised and all of them showed abnormal chromosomal count, ranging from 30 to 158 chromosomes, with most of the mitosis presenting around 70 chromosomes. We never observed a normal count in MSCs while lymphocytes from the same mouse strain presented a regular 40 chromosomes karyotype. Moreover, we obtained exactly the same results when MSCs were isolated from other mouse strains: BTBR $T^+ tf/J$ or C57BL/6J.

We carefully checked if the cells we isolated presented MSC properties : they were able to form single colony clusters (CFU-F). By flow cytometry analysis, we verified that these cells present murine mesenchymal stem cell markers (Figure 3) : they harboured Sca-1 and CD106 cell markers, and half of these MSC cultures presented the CD90.2. The differentiation capacities of these MSCs were also explored (Figure 4 and Table 1). They always preserved their osteogenic potential. Their adipogenic potential is lost in half of the cases. Their chondrogenic potential was tested by micromass culture in presence or absence of chondrogenic differentiation medium. Although, we observed a week toluidine blue staining of the micromass even in the absence of chondrogenic differentiation medium, 3 of the 6 tested MSC cultures presented a stronger staining after incubation with the chondrogenic medium. Genomic instability of the murine MSCs has previously been reported by two other research groups who have also shown occasional sarcoma formation in mice injected with bone marrow-derived MSCs [12, 13, 21]. Miura *et al.* showed that karyotypic abnormalities occurred frequently and very early in the purification process. They characterized in details the genomic aberrations observed by spectral karyotyping, FISH analysis and telomerase activity assays. In accordance with our results, the group of Tolar *et al.* confirmed that this phenomenon is strain independent.

In opposition to these previous studies, the transformation was systematic and, critically, could not be avoided. In our hands, all the culture protocols and different mouse strains led finally to genetically abnormal cells. We can not explain this discrepancy between our work and the other reports as we used similar isolation and culture protocols. Miura *et al.* observed the transformation of 5/100 single-colony derived BM-MSC clones, so it is likely that they would have observed a systematic transformation if cultures had been derived from whole bone marrow isolates like we did.

Chromosomal instability is increasingly recognized as a key component of tumorigenesis [22]. Moreover, it is likely that the properties of MSCs as engraftment, homing, rooming, immunosuppressive or therapeutic potential could be affected by the genetic modifications observed.

A single report showed human MSC transformation after long-term *ex vivo* culture [14]. This emphasizes the differences between murine and human cells. Human cells require more genetic changes before going into neoplastic transformation than their murine counterparts [23, 24]. Moreover, telomere biology, which is often associated with chromosomal instability in cancer differs between the two species [25].

Maslov and Vjig described that an optimal balance between maintaining a pool of stem cells for tissue regeneration and eliminating severely damaged stem cells ensures maximal longevity, free of cancer and degenerative tissue decline [26]. Greater genomic instability is observed in mouse MSCs compared to human. As a consequence, mice are expected to develop more tumors than humans, or to present a shorter lifespan. Indeed, in case of mutations following genomic instability for example, MSCs undergo apoptosis leading to the rapid exhaustion of the MSC pool destined for tissue regeneration. This difference in genomic stability could in part explain the much shorter lifespan of the mice.

In conclusion, we observed systematic murine bone marrow-derived MSC transformations during isolation and purification. Other groups have reported similar results and this event appeared to be species specific. These data warn the research community about the scientific relevance of murine MSCs for transplantation models. As these cells present drastically damaged genome even after short *ex vivo* culture, their biological properties are likely to be modified. Therefore, they might not be suitable to predict the outcome of any clinical protocol with human MSCs.

Figure legends

Figure 1 : Morphological evaluation of the tumor. **A-B.** HES-stained section showing undifferentiated spindle cells with elongated or pleomorphic nuclei and scant acidophilic cytoplasm with mitotic activity (A) or focal necrotic changes (B).

Figure 2 : Metaphase spread of the tumor-inducing murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Here, 84 chromosomes are present. Images were acquired with Olympus BX51 microscope (Olympus, Aartselaar, Belgium) and the Genetix Applied Imaging acquisition software (Applied Imaging, France).

Figure 3 : A representative flow cytometric analysis of purified bone marrow-derived murine MSCs. A. Upper panel : cells were incubated with CD45-PE or CD11b-PE primary antibodies. Control for PE signal was performed by incubating cells with a PE-labelled immunoglobulin G isotype-matched control. Lower panel : cells were incubated with CD106, Sca-1, or CD34 primary antibodies, following by incubation with secondary antibodies coupled to APC. Control for APC signal was performed by incubating cells with a APC-labelled secondary Ab. B. cells were incubated with CD90.2-FITC primary antibody. Control for FITC signal was performed by incubating cells with a FITC-labelled immunoglobulin G isotype-matched control.

Figure 4 : Osteoblastic, adipocytic and chondrogenic differentiation. Cells were cultured in osteoinductive medium for 2-3 weeks or left untreated and Ca^{2+} deposition was measured (A). Cells were maintained in non differentiating medium (B) or cultured in adipogenic medium for 18 days, and the lipids vacuoles were stained with Oil Red O. Magnification 100x (C) and magnification 200x.(D). Cells were cultured in micromass during 21 days in absence (E) or in the presence (F) of chondrogenic medium and chondrocytes clumps were toluidin blue stained. Nikon Eclipse TS100 with NIS element acquisition software.

References.

1. Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
2. García-Castro J, C Trigueros, J Madrenas, JA Pérez-Simón, R Rodriguez and P Menendez. (2008). Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12:2552-2565.
3. Lee KD, TK Kuo, J Whang-Peng, YF Chung, CT Lin, SH Chou, JR Chen, YP Chen and OK Lee. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40:1275-1284.
4. Hou L, H Cao, D Wang, G Wei, C Bai, Y Zhang and X Pei. (2003). Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *International journal of hematology* 78:256-261.
5. Torrente Y and E Polli. (2008). Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Cell transplantation* 17:1103-1113.
6. Kuo TK, SP Hung, CH Chuang, CT Chen, YR Shih, SC Fang, VW Yang and OK Lee. (2008). Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 134:2111-2121, 2121 e2111-2113.
7. Sasportas LS, R Kasmieh, H Wakimoto, S Hingtgen, JAJM van de Water, G Mohapatra, JL Figueiredo, RL Martuza, R Weissleder and K Shah. (2009). Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:4822-4827.
8. Kanehira M, H Xin, K Hoshino, M Maemondo, H Mizuguchi, T Hayakawa, K Matsumoto, T Nakamura, T Nukiwa and Y Saijo. (2007). Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Ther* 14:894-903.
9. Tisato V, K Naresh, J Girdlestone, C Navarrete and F Dazzi. (2007). Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 21:1992-1999.

10. Le Blanc K, F Frassoni, L Ball, F Locatelli, H Roelofs, I Lewis, E Lanino, B Sundberg, ME Bernardo, M Remberger, G Dini, RM Egeler, A Bacigalupo, W Fibbe and O Ringden. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371:1579-1586.
11. Caplan AI and JE Dennis. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 98:1076-1084.
12. Miura M, Y Miura, HM Padilla-Nash, AA Molinolo, B Fu, V Patel, BM Seo, W Sonoyama, JJ Zheng, CC Baker, W Chen, T Ried and S Shi. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24:1095-1103.
13. Tolar J, AJ Nauta, MJ Osborn, A Panoskaltis Mortari, RT McElmurry, S Bell, L Xia, N Zhou, M Riddle, TM Schroeder, JJ Westendorf, RS McIvor, PC Hogendoorn, K Szuhai, L Oseth, B Hirsch, SR Yant, MA Kay, A Peister, DJ Prockop, WE Fibbe and BR Blazar. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25:371-379.
14. Rubio D, J Garcia-Castro, MC Martin, R de la Fuente, JC Cigudosa, AC Lloyd and A Bernad. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. [Cancer Res](#) 65:3035-3039.
15. Houghton J, C Stoicov, S Nomura, AB Rogers, J Carlson, H Li, X Cai, JG Fox, JR Goldenring and TC Wang. (2004). Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. [Science](#) 306:1568-1571.
16. Bernardo M, N Zaffaroni, F Novara, A Cometa, M Avanzini, A Moretta, D Montagna, R Maccario, R Villa, M Daidone, O Zuffardi and F Locatelli. (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer research* 67:9142-9149.
17. Tropel P, D Noel, N Platet, P Legrand, AL Benabid and F Berger. (2004). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295:395-406.
18. Feldser DM, JA Hackett and CW Greider. (2003). Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer* 3:623-627.

19. Schrepfer S, T Deuse, C Lange, R Katzenberg, H Reichenspurner, RC Robbins and MP Pelletier. (2007). Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16:105-107.
20. Jiang Y, BN Jahagirdar, RL Reinhardt, RE Schwartz, CD Keene, XR Ortiz-Gonzalez, M Reyes, T Lenvik, T Lund, M Blackstad, J Du, S Aldrich, A Lisberg, WC Low, DA Largaespada and CM Verfaillie. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
21. Mohseny AB, K Szuhai, S Romeo, EP Buddingh, I Briaire-de Bruijn, D de Jong, M van Pel, AM Cleton-Jansen and PC Hogendoorn. (2009). Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *The Journal of pathology* 219:294-305.
22. Tusell L, D Soler, M Agostini, J Pampalona and A Genescà. (2008). The number of dysfunctional telomeres in a cell: one amplifies; more than one translocate. *Cytogenetic and genome research* 122:315-325.
23. Rangarajan A, SJ Hong, A Gifford and RA Weinberg. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer cell* 6:171-183.
24. Boehm JS, MT Hession, SE Bulmer and WC Hahn. (2005). Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Molecular and cellular biology* 25:6464-6474.
25. Prowse KR and CW Greider. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4818-4822.
26. Maslov AY and J Vijg. (2009). Genome instability, cancer and aging. *Biochim Biophys Acta* 1790:963-969.

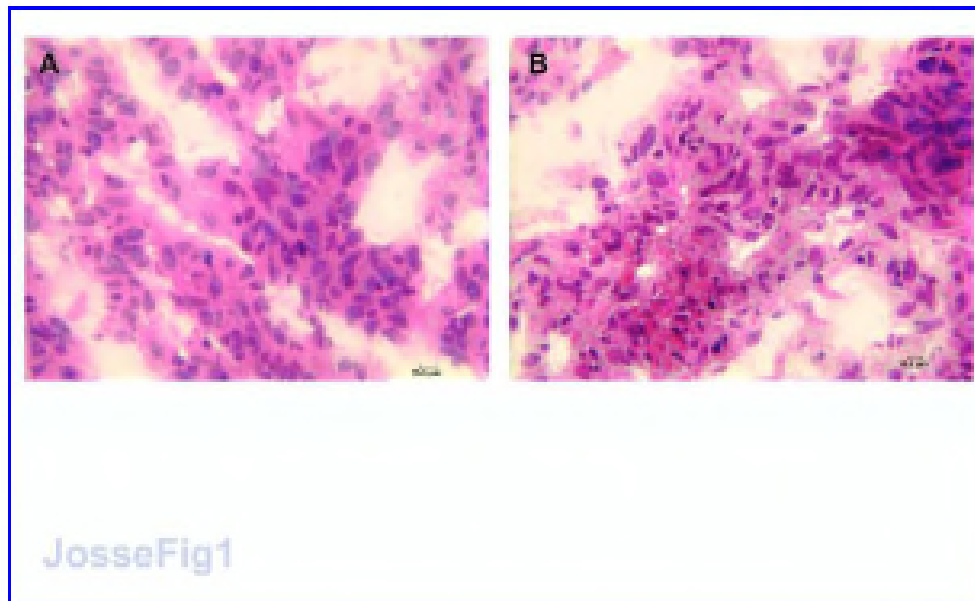


Figure 1 : Morphological evaluation of the tumor. A-B. HES-stained section showing undifferentiated spindle cells with elongated or pleomorphic nuclei and scant acidophilic cytoplasm with mitotic activity (A) or focal necrotic changes (B).
210x130mm (409 x 409 DPI)

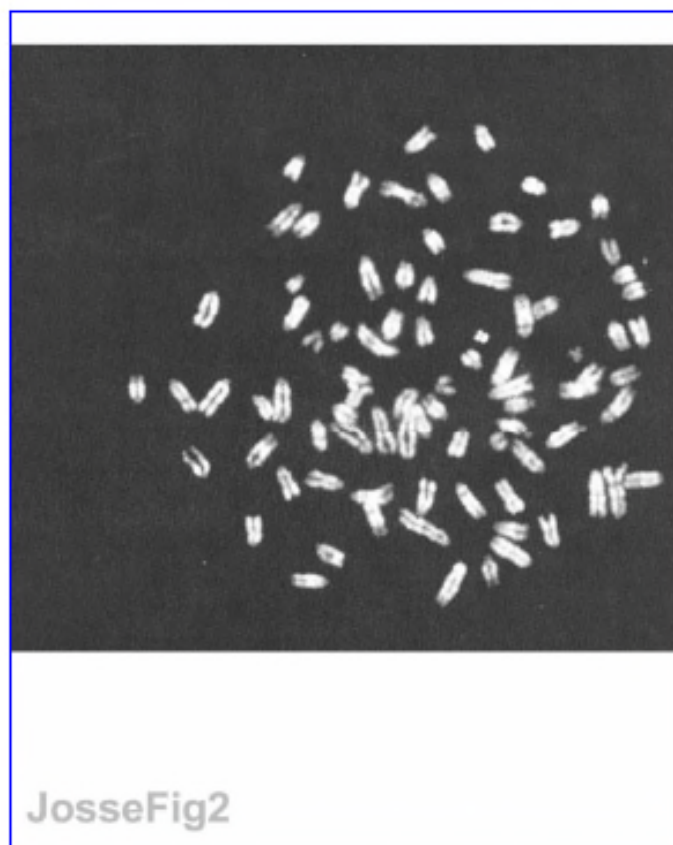


Figure 2 : Metaphase spread of the tumor-inducing murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Here, 84 chromosomes are present. Images were acquired with Olympus BX51 microscope (Olympus, Aartselaar, Belgium) and the Genetix Applied Imaging acquisition software (Applied Imaging, France).
80x100mm (518 x 518 DPI)

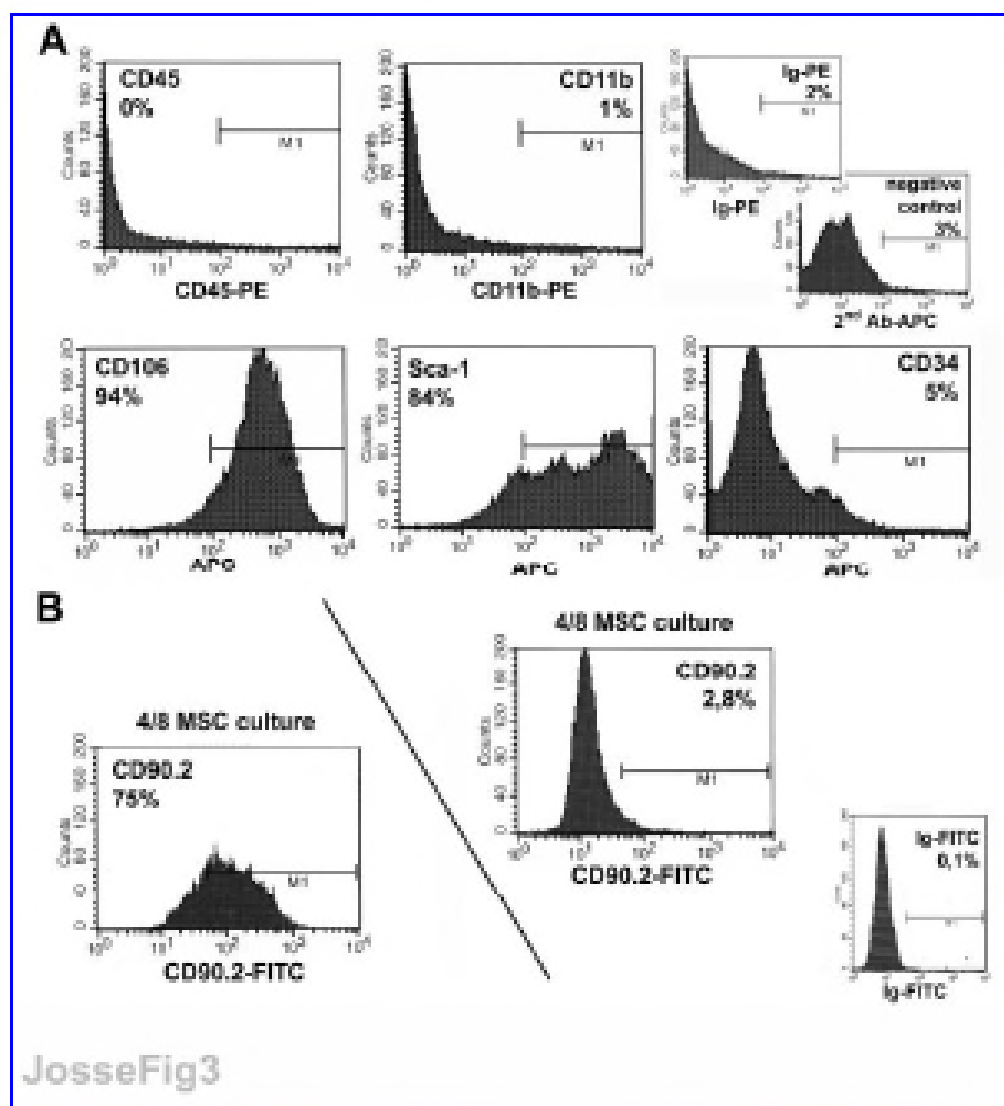


Figure 3 : A representative flow cytometric analysis of purified bone marrow-derived murine MSCs. A. Upper panel : cells were incubated with CD45-PE or CD11b-PE primary antibodies. Control for PE signal was performed by incubating cells with a PE-labelled immunoglobulin G isotype-matched control. Lower panel : cells were incubated with CD106, Sca-1, or CD34 primary antibodies, following by incubation with secondary antibodies coupled to APC. Control for APC signal was performed by incubating cells with a APC-labelled secondary Ab. B. cells were incubated with CD90.2-FITC primary antibody. Control for FITC signal was performed by incubating cells with a FITC-labelled immunoglobulin G isotype-matched control.

209x230mm (360 x 360 DPI)

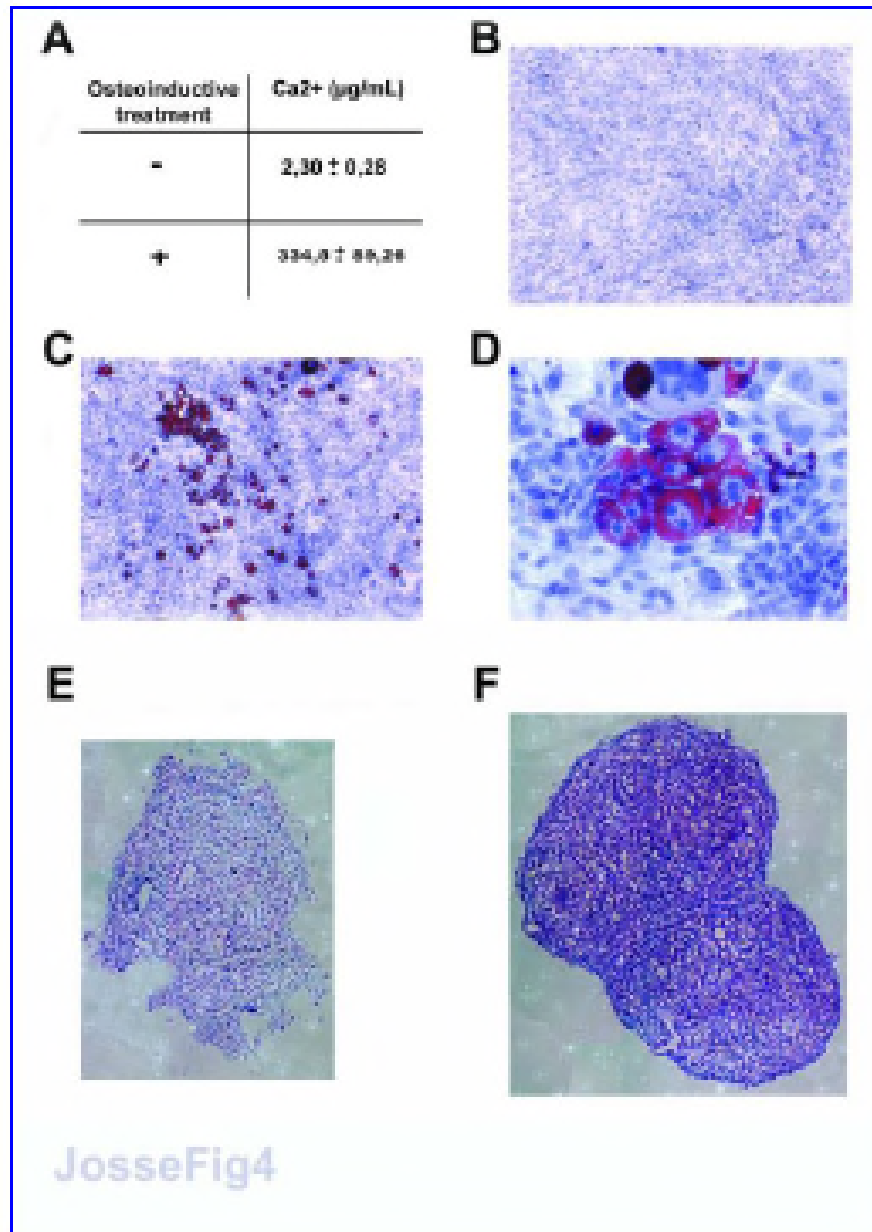


Figure 4 : Osteoblastic, adipocytic and chondrogenic differentiation. Cells were cultured in osteoinductive medium for 2-3 weeks or left untreated and Ca²⁺ deposition was measured (A). Cells were maintained in non differentiating medium (B) or cultured in adipogenic medium for 18 days, and the lipids vacuoles were stained with Oil Red O. Magnification 100x (C) and magnification 200x.(D). Cells were cultured in micromass during 21 days in absence (E) or in the presence (F) of chondrogenic medium and chondrocytes clumps were toluidin blue stained. Nikon Eclipse TS100 with NIS element acquisition software.
162x230mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Conditions of murine bone marrow-derived MSC purification and cell characterization

Strain	Culture duration (month)	Negative selection	Passage number	Culture medium	Flow cytometry						Differentiation			Chromosome number									
					CD45	CD34	CD11b	CD106	Sca-1	CD90.2	Osteo	Adipo	Chondro	mitoses	40	70	120						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	5,2	yes	5	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF																			
BTBR-Pah ^{ms2} /J	2,1	yes	2	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR-Pah ^{ms2} /J	2,1	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR-Pah ^{ms2} /J	2,9	yes	2	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR-Pah ^{ms2} /J	5,0	yes	6	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR-Pah ^{ms2} /J	3,2	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF	0,4%	3,8%	4,0%	31,1%	75,6%	80,6%	+	-	+	12	2	10	0						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	1,6	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF	0,0%	1,0%	0,2%	30,5%	67,2%	61,3%	+	-	-	0	1	7	0						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	3,6	yes	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF	0,1%	0,7%	0,1%	38,6%	97,1%	63,9%	+	-	+	23	0	23	0						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	2,6	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR T ^{+/+} /J	4,1	no	5	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR T ^{+/+} /J	2,7	no	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
BTBR T ^{+/+} /J	3,5	no	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
C57BL/6	3,3	no	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS																			
C57BL/6	/	no	/	DMEMF12 + 10% FBS																			
C57BL/6	/	no	6	DMEM + 10% FBS																			
BTBR-Pah ^{ms2} /J	3,4	no	13	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0,9%	5,5%	0,2%	30,8%	40,6%	0,9%	+	+	-	13	0	11	2						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	3,5	no	10	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	2,0%	85,9%	1,8%	30,7%	52,1%	83,1%	+	+	+	20	0	20	0						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	3,5	no	10	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	1,2%	12,9%	2,1%	72,4%	71,6%	0,1%	ND	ND	ND	22	0	2	20						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	5,4	no	15	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0,3%	5,8%	0,8%	34,6%	64,2%	2,8%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
BTBR-Pah ^{ms2} /J	3,5	no	11	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0,6%	12,8%	0,6%	30,3%	69,9%	2,2%	+	+	-	23	1	20	2						
BTBR-Pah ^{ms2} /J	4,1	no	12	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell																			

Table 1 : MSC cultures were realised from bone marrow of different mouse strains BTBR-Pah^{ms2}/J, BTBR T^{+/+}/J or C57BL/6. MSC purification was performed by adherence and passages until they were free from hematopoietic cells as assessed by flow cytometry, or by immunodepletion. Culture duration until the metaphase spread study is indicated, as well as the culture passage numbers. When indicated, an hematopoietic cell immunodepletion was realised using anti-CD34, anti-CD45 and anti-CD11b antibodies. The culture medium used is specified for each culture (FBS : foetal bovine serum, HS : horse serum, HGF : hepatocyte growth factor). Some MSC cultures were characterized by flow cytometry for the murine mesenchymal stem cell markers Sca-1, CD106 and CD90.2, and to assess their purity, for the hematopoietic cell markers CD34, CD45 and CD11b. MSC differentiation potential into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes was checked after cell culture in specific differentiation media. Calcium deposition measurement was realised in the osteoblasts, lipid vacuoles were stained with Oil Red O for adipocytes, and toluidin blue staining was realized on micromass culture for chondrocytes. The total number of analysed mitosis is indicated, and the chromosome count is divided into 3 subcategories : nearly normal (around 40 chromosomes), nearly tetraploid (around 70 chromosomes), and hyperploïd (around 120 chromosomes). ND: not determined

Table 1 : MSC cultures were realised from bone marrow of different mouse strains BTBR-Pahenu2/J, BTBR T+ tf/J or C57BL/6. MSC purification was performed by adherence and passages until they were free from hematopoietic cells as assessed by flow cytometry, or by immunodepletion.

Culture duration until the metaphase spread study is indicated, as well as the culture passage numbers. When indicated, an hematopoietic cell immunodepletion was realised using anti-CD34, anti-CD45 and anti-CD11b antibodies. The culture medium used is specified for each culture (FBS : foetal bovine serum, HS : horse serum, HGF : hepatocyte growth factor). Some MSC cultures were characterized by flow cytometry for the murine mesenchymal stem cell markers Sca-1, CD106 and CD90.2, and to assess their purity, for the hematopoietic cell markers CD34, CD45 and CD11b. MSC differentiation potential into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes was checked after cell culture in specific differentiation media. Calcium deposition measurement was realised in the osteoblasts, lipid vacuoles were stained with Oil Red O for adipocytes, and toluidin blue staining was realized on micromass culture for chondrocytes. The total number of analysed mitosis is indicated, and the chromosome count is divided into 3 subcategories : nearly normal (around 40 chromosomes), nearly tetraploid (around 70 chromosomes), and hyperploïd (around 120 chromosomes). ND: not determined.

260x152mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Conditions of murine bone marrow-derived MSC purification and cell characterization

Strain	Culture duration (month)	Negative selection	Passage number	Culture medium	Flow cytometry					Differentiation			Chromosome number				
					CD45	CD34	CD11b	CD106	Sca-1	CD90.2	Osteo	Adipo	Chondro	mitoses	40	70	120
BTBR-Pah ^{ex2} /J	5.2	yes	5	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF							ND	ND	ND	25	0	25	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	2.1	yes	2	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	17	0	16	1
BTBR-Pah ^{ex2} /J	2.1	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	13	0	13	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	2.9	yes	2	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	10	0	10	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	5.0	yes	6	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	24	0	21	3
BTBR-Pah ^{ex2} /J	3.2	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF	0.4%	3.8%	4.0%	81.1%	75.6%	80.6%	+	-	+	12	2	10	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	1.8	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF	0.0%	1.0%	0.2%	99.2%	97.2%	91.1%	+	-	-	9	1	7	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	3.6	yes	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS + 20ng/mL HGF	0.1%	0.7%	0.1%	98.6%	97.1%	63.9%	+	-	+	23	0	23	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	2.6	yes	3	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	10	4	6	0
BTBR T ^{+/+} /J	4.1	no	5	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	4	0	0	4
BTBR T ^{+/+} /J	2.7	no	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	16	7	9	0
BTBR T ^{+/+} /J	3.5	no	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	6	0	4	2
C57BL/6	3.3	no	4	DMEMF12 + 10% FBS + 10% HS							ND	ND	ND	15	0	13	2
C57BL/6	/	no	7	DMEM + 10% FBS							ND	ND	ND	15	1	9	5
C57BL/6	/	no	6	DMEM + 10% FBS							ND	ND	ND	12	0	10	2
BTBR-Pah ^{ex2} /J	3.4	no	13	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0.9%	5.5%	0.2%	30.8%	40.8%	0.9%	+	+	-	13	0	11	2
BTBR-Pah ^{ex2} /J	3.5	no	10	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	2.0%	85.9%	1.8%	90.7%	92.1%	83.1%	+	+	+	20	0	20	0
BTBR-Pah ^{ex2} /J	3.5	no	10	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	1.2%	12.9%	2.1%	72.4%	71.5%	0.1%	ND	ND	ND	22	0	2	20
BTBR-Pah ^{ex2} /J	5.4	no	15	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0.3%	5.8%	0.9%	94.8%	84.2%	2.8%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BTBR-Pah ^{ex2} /J	3.5	no	11	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0.6%	12.8%	0.6%	93.3%	69.9%	2.2%	+	+	-	23	1	20	2
BTBR-Pah ^{ex2} /J	4.1	no	12	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell							ND	ND	ND	20	2	18	0

Table 1 : MSC cultures were realised from bone marrow of different mouse strains BTBR-Pah^{ex2}/J, BTBR T^{+/+}/J or C57BL/6. MSC purification was performed by adherence and passages until they were free from hematopoietic cells as assessed by flow cytometry, or by immunodepletion.

Culture duration until the metaphase spread study is indicated, as well as the culture passage numbers. When indicated, an hematopoietic cell immunodepletion was realised using anti-CD34, anti-CD45 and anti-CD11b antibodies. The culture medium used is specified for each culture (FBS : foetal bovine serum, HS : horse serum, HGF : hepatocyte growth factor). Some MSC cultures were characterized by flow cytometry for the murine mesenchymal stem cell markers Sca-1, CD106 and CD90.2, and to assess their purity, for the hematopoietic cell markers CD34, CD45 and CD11b. MSC differentiation potential into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes was checked after cell culture in specific differentiation media. Calcium deposition measurement was realised in the osteoblasts, lipid vacuoles were stained with Oil Red O for adipocytes, and toluidin blue staining was realized on micromass culture for chondrocytes. The total number of analysed mitosis is indicated, and the chromosome count is divided into 3 subcategories : nearly normal (around 40 chromosomes), nearly tetraploid (around 70 chromosomes), and hyperploid (around 120 chromosomes). ND: not determined.

ORIGINAL ARTICLE

Spontaneous and granulocyte–colony-stimulating factor-enhanced marrow response and progenitor cell mobilization in mice after myocardial infarction

MARIE DELGAUDINE, ANDRÉ GOTHOT & YVES BEGUIN

Giga-Research, Hematology Unit, University of Liège, Liège, Belgium

Abstract

Background aims. Hematopoietic (HPC), mesenchymal (MPC) and/or endothelial (EPC) progenitor cells are being studied to repair the myocardium after acute or chronic ischemia. We examined marrow response to myocardial infarction (MI) and the ability of granulocyte–colony-stimulating factor (G-CSF) to enhance mobilization of HPC, MPC and EPC in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) of MI mice. **Methods.** We induced MI in C57Bl/6 mice, while sham-operated (SO) animals were similarly operated on but without coronary artery ligation. Animals were treated with either saline or G-CSF, from day –5 to day +5 after MI or from day 0 to day +5. Progenitor cell numbers in PB and BM were evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis and cell culture. **Results.** White blood cells (WBC) decreased in BM and increased in PB after MI; G-CSF amplified this effect in BM but not in PB. HPC numbers decreased in BM after MI, while HPC and granulocyte–macrophage colony-forming units (GM-CFU) increased in PB only after G-CSF treatment, and more prominently so in MI than in SO mice. MPC and fibroblast–colony-forming units (F-CFU) as well as EPC were mobilized into the PB after MI and further after G-CSF treatment. Plasma troponin T concentrations decreased after G-CSF treatment. **Conclusions.** BM is globally affected by acute MI, but not simple body injury, with intense mobilization of marrow MPC and EPC into the PB but inhibition of HPC. Progenitor cell entry into the PB may be paralleled by depletion of their BM pools. G-CSF is required for HPC mobilization and enhances MPC and EPC entry into the PB.

Key Words: *endothelial progenitor cells, granulocyte–colony-stimulating factor, hematopoietic progenitor cells, mesenchymal progenitor cells, mobilization, myocardial infarction, progenitor cells, stem cells*

Introduction

Ischemic myocardial damage is a major cause of heart failure. Reversal of heart failure would require replacement of damaged myocytes and improvement of blood flow. Animal experiments as well as clinical studies have suggested that bone marrow (BM) stem cells may contribute to cardiac repair and improve cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction (MI) (1,2). However, the desirable type of stem cells and optimal timing and route for their administration remain undetermined. A possible option is to mobilize BM stem and progenitor cells into the peripheral blood (PB), with the hope that these cells home to the damaged myocardium and contribute to its healing and repair.

Some previous reports have described elevations of endothelial progenitor cells (EPC) in PB of patients with acute MI.

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is a 25-kDa glycoprotein that induces mobilization into the PB of hematopoietic stem cells (HSC) and possibly mesenchymal progenitor cells (MPC) and EPC. HSC appear to have the capacity to both home to the damaged myocardium and regenerate it (3,4) but some reports have suggested that HSC do not transdifferentiate into cardiomyocytes after MI (5,6). Mesenchymal stromal cells (MSC) can differentiate into a variety of non-hematopoietic cell types, including cardiomyocytes and endothelial cells (EC) (7). EPC have been studied as biomarkers of

Correspondence: Yves Beguin, MD, University of Liège, Department of Hematology, CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgium. E-mail: yves.beguina@chu.ulg.ac.be

(Received 7 July 2009; accepted 22 December 2009)

ISSN 1465-3249 print/ISSN 1477-2566 online © 2010 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)
DOI: 10.3109/14653240903580262

cardiovascular disease as well as a cell-based therapy for repair of damaged blood vessels (8,9). Several mechanisms of G-CSF activity after MI have been proposed, including mobilization, homing and differentiation of BM cells into cardiomyocytes and EC, direct anti-apoptotic effects on cardiomyocytes by activation of the STAT3 and JAK2 pathways, and enhanced resorption of necrotic tissue and reduction of granulation and scar tissue via expression of matrix metalloproteases (10).

In the present study, MI was induced in mice by ligation of the left anterior descending coronary artery, and G-CSF was administered daily either after (from day 0 to day +5) or before and after (from day -5 to day +5) MI. Our general objective was to investigate the global marrow response to heart injury; the specific aims were to: (i) analyze the response of progenitor cells in PB and BM to MI compared with simple body injury (sham operation); (ii) examine further the ability of G-CSF (given either before and after or only after MI) to mobilize progenitor cells into the PB in such situations of body and heart injury; and (iii) investigate whether HPC, MPC and EPC respond in a similar or different fashion to such injuries with or without G-CSF mobilization.

Methods

The investigation conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication number 85-23, revised 1996). Animal experiments were performed in accordance with institutional guidelines and approved by the Animal Care Ethical Committee of the University of Liège (Liège, Belgium).

Myocardial infarction

MI was induced in female C57Bl/6 mice at 2 months of age. Anesthesia was induced using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Mice were intubated orally with a 22-gauge vinyl catheter, and positive pressure ventilation (0.3 mL/min, 160 breaths/min) was maintained with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). The mouse heart was exposed through a 1-cm left lateral thoracotomy. The left anterior descending coronary artery of each mouse was ligated with an 8-0 polypropylene silk suture. The chest wall, muscle layers and skin were then closed with an interrupted 6-0 polypropylene silk suture. Intubation was discontinued once spontaneous breathing resumed, and the mice were allowed to recover on a heated platform. Sham-operated (SO) animals were exposed to exactly the same surgical

procedure except that their left anterior descending coronary artery was not ligated.

Experimental protocol

Animals were divided into five groups. SO animals were not treated (group 1) or received daily subcutaneous injections of G-CSF (50 µg/kg) from day 0 to day +5 (group 2). MI mice were treated with daily subcutaneous injections of either saline from day 0 to day +5 (group 3) or G-CSF (50 µg/kg) either from day 0 to day +5 (group 4) or from day -5 to day +5 after MI (group 5). Animals were killed 7 days after MI induction. In each group, 12 animals were followed for blood parameters, cytometry, granulocyte-macrophage colony-forming unit (GM-CFU) and fibroblast-colony-forming unit (F-CFU) analysis, and 12 other mice for troponin T measurements.

Blood parameters

After killing, blood was obtained from the inferior vena cava and BM was collected from femurs and tibias. Blood and BM cells were counted in an ABX micro 60 automatic cell counter (HORIBA ABX Diagnostics, Antwerp, Belgium). Blood and BM cells were then washed and the supernatant eliminated. Plasma samples obtained from lithium-heparinized blood were analyzed for cardiac troponin T on an Elecsys® 1010 (Roche Diagnostics, Meylan, France). This assay has no cross-reactivity with skeletal troponin T. Plasma samples were also analyzed for G-CSF and SDF-1 levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; RayBiotech, Tebubio SA, Le Perray en Yvelines, France). For flow cytometric analyzes, 5 µL monoclonal antibody (MAb) rat anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD45 (IgG2bκ), biotin-conjugated CD34 (IgG2aκ), phycoerythrin (PE)-conjugated CD31 (IgG2aκ), PE-conjugated CD11b (IgG2bκ), biotin-conjugated CD106 (VCAM 1, IgG2aκ), PE-conjugated CD117 (c-Kit, IgG2bκ) or biotin-conjugated Sca1 (IgG2aκ) (all from BD Biosciences) were added to the pellet and the cells incubated for 30 min at 4°C. Cells were washed and 5 µL streptavidin APC (Molecular Probes, Invitrogen, Merelbeke, Belgium) added to the pellet to reveal biotinylated antibodies, and the cells were incubated for 30 min at 4°C. Red cells were lysed with NH₄Cl for 10 min, and nucleated cells were then washed and fixed in phosphate-buffered saline (PBS) 1% formaldehyde. Samples were analyzed on a FACSCANTO (BD Biosciences). The following antibody combinations were studied: CD45⁺ Kit⁺ Sca⁺, HPC (11); CD45⁻106⁺ 11b⁻, MPC (12); and CD45⁻34⁺ 31⁺, EPC (13,14).

GM-CFU

Cells were plated at 5×10^4 cells/35-mm dish for BM and 2×10^5 cells/35-mm dish for blood in Methocult® GF M3434 media (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) for 16 days. After 14 days, numbers of GM-CFU (colonies with ≥ 100 cells) were scored with an inverted microscope with $\times 40$ magnification.

F-CFU

Cells were plated at 5×10^4 cells/25-cm² flask for BM and 2×10^5 cells/25-cm² flask for blood in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Merelbeke, Belgium), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The medium was changed every 3 days for a total of 21 days. Plates were then fixed in methanol and stained with hematoxylin-eosin at room temperature for 10 min and F-CFU (colonies with ≥ 50 cells) were counted.

Differentiation of MPC into chondrocytes, osteocytes and adipocytes

We sorted CD45⁻ CD106⁺ CD11b⁻ cells and verified their capacity to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. Cells were plated at 500 cells/cm² in 58-cm² dishes and incubated in DMEM with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin for 10 days.

For osteogenesis, the cultures were then incubated in DMEM supplemented with 10% FCS, 10% HS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 12 mM L-glutamine, 20 mM β-glycerol phosphate (Sigma, St Louis, MO, USA), 50 ng/mL thyroxine (Sigma), 1 nM dexamethasone (Sigma) and 0.5 µM ascorbate phosphate (Sigma). The medium was changed twice a week for 3 weeks. The cells were fixed with 10% formalin for 20 min at room temperature and stained with Alizarin red, pH 4.1 (Sigma), for 20 min at room temperature.

For adipogenesis, the cultures were incubated in DMEM supplemented with 10% FCS, 10% HS, 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin, 12 mM L-glutamine, 5 g/mL insulin (Sigma), 50 µM indomethacin (Sigma), 1×10^{-6} M dexamethasone and 0.5 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; Sigma). The medium was changed twice a week for 3 weeks. The cells were fixed with 10% formalin for 20 min at room temperature and stained with 0.5% Oil red O (Sigma) in methanol (Sigma) for 20 min at room temperature.

For chondrocyte differentiation, a pellet culture system was used. Approximately 200 000 cells were

placed in a 15-mL polypropylene tube (Falcon, Bedford, MA, USA) and centrifuged to pellet. The pellet was cultured at 37°C with 5% CO₂ in 500 µL chondrogenic media that contained 500 ng/mL bone morphogenetic protein-6 (BMP-6; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in addition to high-glucose DMEM supplemented with 10 ng/mL transforming growth factor-β3 (TGF-β3), 10^{-7} M dexamethasone, 50 µg/mL ascorbate-2-phosphate, 40 µg/mL proline, 100 g/mL pyruvate and 50 mg/mL ITS Premix (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA; 6.25 µg/mL insulin, 6.25 µg/mL transferrin, 6.25 ng/mL selenious acid, 1.25 mg/mL bovine serum albumin and 5.35 mg/mL linoleic acid). The medium was replaced every 3–4 days for 21 days. For microscopy, the pellets were embedded in paraffin, cut into 5-µm sections and stained with toluidine blue sodium borate.

Histology and infarct size determination

Excised hearts were stained in a solution of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC), 1.0% in phosphate buffer (pH 7.4). The hearts were weighed and cut into four 1-mm thick transverse slices and fixed in formalin. Each slice was weighed and ImageJ software (Bethesda, MD, USA) used to planimeter the borders of the entire heart and the infarcted area. Paraffin-embedded tissue samples were cut into 4-µm sections. Infarct size was also determined planimetrically with Histolab software (Microvisions, Paris, France) after Masson's trichrome staining. The weight (W) of each transverse slice was expressed as a proportion of the total weight of the heart. For each transverse slice, the infarcted area (S) was expressed as a proportion of the total area of that slice. The total infarcted area (%) was calculated as follows: [(W × S) slice 1 + (W × S) slice 2 + (W × S) slice 3 + (W × S) slice 4] × 100.

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SD. The Gaussian distribution of the population was tested. Comparisons between groups of mice were done using two-tailed Student's *t*-tests or by two-way ANOVA. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

White blood cells

Blood and marrow parameters were measured upon killing, which took place 7 days after MI, i.e. 48 h after the last dose of G-CSF in G-CSF-treated animals. The hematocrit and platelet count were

not different among the groups (data not shown). WBC in BM decreased after MI ($P < 0.05$) and this was amplified after G-CSF treatment ($P < 0.001$) (Figure 1). The WBC count in PB increased after MI ($P < 0.05$), while the effect of G-CSF on WBC was no longer apparent after 2 days of discontinuation.

HPC number in PB and BM

Compared with SO animals, MI mice had lower numbers of $CD45^+ Kit^+ Sca^+$ HPC in BM ($P < 0.001$) (Figure 2). Forty-eight hours after the last dose G-CSF, BM HPC were increased in MI mice ($P < 0.001$) but decreased in SO animals ($P < 0.01$). HPC were mobilized in PB only after G-CSF treatment ($P < 0.001$) and this was more prominent in MI than in SO mice ($P < 0.001$).

MPC and EPC numbers in PB and BM

After MI, the number of $CD45^- 106^+ 11b^-$ MPC and $CD45^- 34^+ 31^+$ EPC in BM decreased slightly (NS), while PB MPC and EPC were increased more than 10-fold ($P < 0.001$) and eight-fold ($P < 0.001$), respectively (Figure 2). G-CSF caused a significant elevation of MPC ($P < 0.001$) and EPC ($P < 0.001$) in BM and further mobilized both types of progenitor cells in PB in MI ($P < 0.05$) and SO ($P < 0.01$) animals alike. We also successfully differentiated sorted $CD45^- 106^+ 11b^-$ MPC into adipocytes, chondrocytes and osteocytes.

GM-CFU analysis

After MI, the number of GM-CFU did not change in BM but decreased in PB ($P < 0.01$) (Figure 3). G-CSF therapy significantly reduced the number

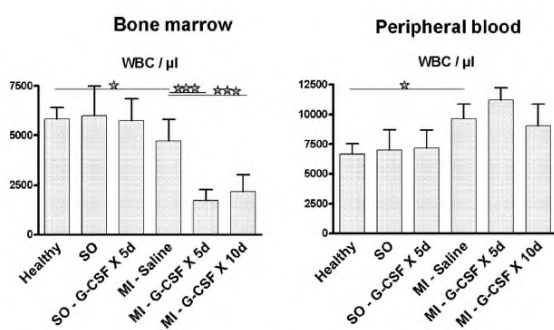


Figure 1. Blood and marrow WBC counts ($M \pm SD$) in healthy mice, SO animals with or without G-CSF therapy, and MI mice receiving either saline or G-CSF for 5 or 10 days ($n=12$ in each group). Parameters were measured on day 7 after MI or SO, i.e. 48 h after the last dose of G-CSF in mice receiving G-CSF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

of BM GM-CFU in MI ($P < 0.001$) but not in SO mice, while PB GM-CFU were elevated in SO ($P < 0.05$) and even more so in MI ($P < 0.001$) animals. Hence, SO and MI mice had similar numbers of GM-CFU in PB after 5 days but not 10 days ($P < 0.001$) of G-CSF therapy.

F-CFU analysis

After MI, the number of F-CFU greatly decreased in BM ($P < 0.001$) but strongly increased in PB ($P < 0.001$) (Figure 3). G-CSF therapy very much reduced the number of BM F-CFU in both conditions ($P < 0.001$), but mobilized F-CFU in PB only in the SO group ($P < 0.001$). There was no strict correlation between the numbers of F-CFU and MPC, as identified by flow cytometry. Our

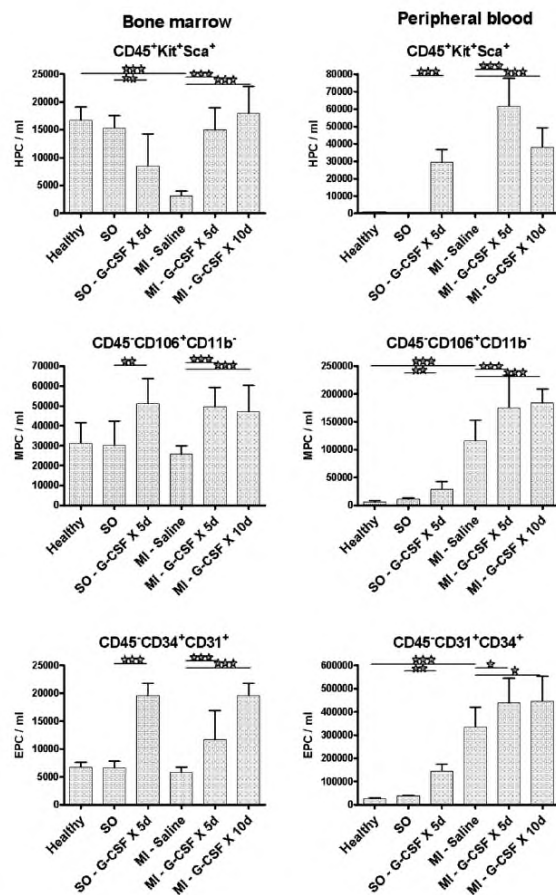


Figure 2. Blood and marrow HPC, MPC and EPC ($M \pm SD$) as measured by flow cytometry in healthy mice, SO animals with or without G-CSF therapy, and MI mice receiving either saline or G-CSF for 5 or 10 days ($n=12$ in each group). Parameters were measured on day 7 after MI or SO, i.e. 48 h after the last dose of G-CSF in mice receiving G-CSF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

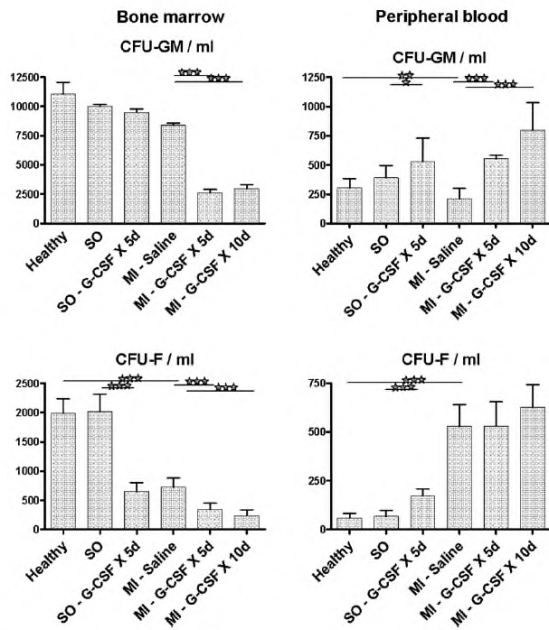


Figure 3. Blood and marrow GM-CFU and F-CFU ($M \pm SD$) as measured by colony assays in healthy mice, SO animals with or without G-CSF therapy, and MI mice receiving either saline or G-CSF for 5 or 10 days ($n=12$ in each group). Parameters were measured on day 7 after MI or SO, i.e. 48 h after the last dose of G-CSF in mice receiving G-CSF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

hypothesis was that many MPC do not read out in colony assays. However, to exclude a contamination by macrophages or endothelial cells, we performed CD45-CD14 and CD45-CD31 double staining on F-CFU colonies. No doubly positive cells were detected. In addition, flow cytometric analysis of cells within the F-CFU showed that these colonies did not contain cells positive for CD34 or CD45, containing 2% CD11b⁺ cells and 60% CD106⁺ SCA⁺ cells (MPC). These colonies thus consisted mainly of mesenchymal cells.

Plasma assays

Troponin T concentrations increased significantly in PB after MI ($P < 0.001$) but not in SO mice (Figure 4). G-CSF therapy considerably reduced troponin T concentrations after 5 days ($P < 0.01$) and even more so after 10 days ($P < 0.001$) of G-CSF therapy.

G-CSF injection in healthy animals appeared to reduce plasma levels of SDF-1 ($P < 0.05$). We observed a significant increase of SDF-1 and G-CSF levels after MI ($P < 0.05$). In mice treated with G-CSF for 5 days, the increase in SDF-1 and G-CSF levels was strongly limited ($P < 0.05$) and even reduced below the values of untreated healthy animals for SDF-1. In those treated with G-CSF for

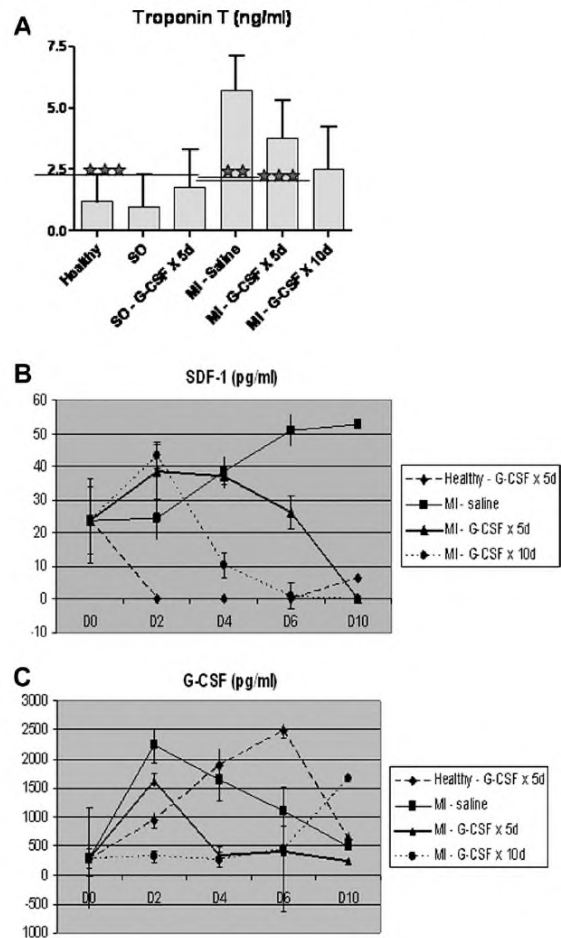


Figure 4. Blood troponin T (A), SDF-1 (B) and G-CSF (C) concentrations in healthy mice, SO animals with or without G-CSF therapy, and MI mice receiving either saline or G-CSF for 5 or 10 days. Troponin T was measured on day 7 after MI or SO, i.e. 48 h after the last dose of G-CSF in mice receiving G-CSF ($n=12$ in each group). SDF-1 and G-CSF were measured at days 2, 4, 6 and 10 after coronary artery ligation or after the beginning of the indicated treatment ($n=3$ in each group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

10 days, the response was similar ($P < 0.05$) except that G-CSF levels did not increase at all.

Histology

As shown by hematoxylin-eosin staining, infarcts included most of the anterior and lateral walls and the entire apex and often extended to the mid and apical portions of the inferior wall. The septum was generally spared. WBC infiltration (mostly polynuclear neutrophils) decreased after 10 but not 5 days of G-CSF treatment. The fibrosis area by TTC staining decreased from $52 \pm 12\%$ in saline-treated animals to $48 \pm 4\%$ (NS) in mice treated with G-CSF for

5 days and $36 \pm 7\%$ ($P < 0.01$) in those treated for 10 days with G-CSF ($P < 0.001$ compared with 5 days of G-CSF). Collagen deposition by trichrome staining showed similar results but the infarct size was systematically smaller by approximately 5% [$48 \pm 14\%$ in saline-treated animals versus $43 \pm 5\%$ (NS) in mice treated with G-CSF for 5 days and $31 \pm 5\%$ ($P < 0.01$) in those treated for 10 days with G-CSF ($P < 0.001$ compared with 5 days of G-CSF)].

Discussion

We have examined the impact of MI induced by coronary artery ligation on hematologic parameters. Our study is the first to provide a concurrent analysis of HPC, MPC and EPC, and to examine the BM and PB simultaneously. This unique simultaneous investigation of all three cell types in marrow and blood allowed us to identify very different responses by different cell populations. Indeed, hematopoietic cells were clearly inhibited in the BM, resulting in decreased numbers in PB as well, while mesenchymal cells and EPC tended to decrease in BM, but more probably through intense mobilization into the PB. Massa *et al.* (15) showed that the WBC count was significantly higher in patients with acute MI at admission. We also observed that the WBC count was elevated in PB, and additionally that it was decreased in BM, both possibly because of the inflammatory process in the heart, as shown by myocardial infiltration with inflammatory cells (data not shown). In addition, it is commonly accepted that monocytic cells can act as pro-angiogenic cells, and it would be of interest to see whether M-CFU or CD14⁺ monocytes are changed in the BM and PB after MI. Massa *et al.* (15) also noticed that HPC increased in the early phase of the disease, and Wojakowski *et al.* (16) found that the number of CD34–CXCR4 and CD34–CD117 double-positive cells increased in patients with acute ST elevation MI (STEMI) compared with healthy subjects. However, in our study the number of HPC and GM-CFU decreased both in BM and PB, possibly as a result of post-inflammatory inhibition of hematopoiesis after MI. These discrepancies may be explained by differences in species studied and in timing of analysis relative to MI. Several reports have indicated that circulating EPC increase after acute coronary syndromes, cardiac surgery (15,17) and arterial injury (18). Spontaneous fluctuations of MSC numbers in PB associated with the time–course of STEMI have also been described (19). In our study, the numbers of MPC and EPC were not changed while F-CFU decreased in the BM and all three parameters increased considerably in the PB, confirming intense

mobilization of these progenitors in response to myocardial inflammation.

We also examined whether progenitor cell changes in the BM and PB were mostly the result of heart injury or were, in part or overall, the result of unspecific body injury as represented by SO. Our results clearly demonstrate that most changes are not related to simple body injury but are largely attributable to MI itself, supporting the hypothesis that MI produces signals that affect cell proliferation in and mobilization from the BM. Dai *et al.* (20) showed an increase of c-Kit⁺ cells after myocardial ischemia that positively correlated with an increase in serum G-CSF. Brehm *et al.* (21) also observed an increase of G-CSF in patients with STEMI. We thus evaluated G-CSF and SDF-1 levels before and after coronary ligation, and found a significant increase of both molecules after MI, thereby possibly facilitating the mobilization of marrow progenitors. However, the injection of G-CSF appeared to limit these increases both in healthy animals and ligated mice.

We then examined the impact of G-CSF administration on SC mobilization as measured after 48 h of G-CSF cessation. The reduction in WBC count in the BM was amplified after G-CSF treatment, but the impact of G-CSF on PB WBC was no longer apparent. At the same time, BM HPC were increased in MI mice but the number of GM-CFU was decreased compared with SO animals. HSC [as evaluated by both GM-CFU assays and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis] were mobilized in PB by G-CSF treatment, and this was even more prominent after MI than after SO. This indicates that G-CSF-induced HPC mobilization is greatly enhanced by MI. Norol *et al.* (22) also observed an amplification of CD34⁺ cell mobilization after administration of stem cell factor (SCF) and G-CSF in ischemic baboons compared with non-mobilized animals. G-CSF administration was associated with an elevation of CD34⁺ and CD117⁺ cells in patients with large acute MI (23) or chronic ischemic heart disease (24). G-CSF also significantly influenced other types of progenitors, as MPC and EPC were increased in BM and mobilized intensely in PB. F-CFU did not follow the same pattern, but this could be related to their more rapid turnover as progenitors were evaluated 48 h after the last dose of G-CSF, a delay sufficient to obliterate changes in PB WBC counts. The detection of MSC in the PB as well as the possibility of mobilizing these cells by G-CSF remains controversial. Nevertheless, Kassis *et al.* (25) and Liu *et al.* (26) detected these cells in the PB of human healthy donors mobilized by G-CSF. Mansilla *et al.* (27) and Zvaifler *et al.* (28) found cells phenotypically identical to MSC circulating in normal subjects. Tatsumi *et al.* (29) did not detect MPC in murine PB under physiologic conditions

but observed a strong mobilization of these cells after 9 days of treatment by G-CSF. In addition, Lund *et al.* (30) identified an increased number of F-CFU in the PB of volunteers mobilized by G-CSF. Others have also reported that G-CSF increased the number of circulating MSC (24,31) and EPC (24,32) after MI but, to our knowledge, no publication has evaluated simultaneously the evolutions of HPC, MPC (and their CFU potential) and EPC in the PB and BM after G-CSF treatment in the context of MI. On the basis of our results, it appears that G-CSF administration is necessary to mobilize HPC into the circulation, while MI induction is sufficient to recruit MPC and EPC into the PB, although this is clearly amplified by G-CSF therapy.

To evaluate whether our schedules of G-CSF therapy had any impact on cardiac ischemia, we measured cardiac troponin T, a cardio-specific, highly sensitive marker of myocardial damage. Troponin T levels in plasma rose after MI but decreased after 5 or 10 days of G-CSF treatment. In addition, we demonstrated that infarct size diminished after G-CSF therapy. Hence G-CSF appears to have a positive impact on heart ischemia after MI. Additional studies are required to examine the functional consequences of these findings on heart perfusion and function.

There were no major differences in SC mobilization potential between the two schedules of G-CSF treatment, i.e. when starting 5 days before MI followed by 5 more days post-coronary occlusion or when giving it only after MI. Nevertheless, the impact of stem cells already in circulation at the time of MI could be superior to that of progressive SC mobilization taking place only in the days following MI. This should be tested in more detailed experiments evaluating cardiac function.

We examined cell proliferation and mobilization at a fixed time-point after MI. However, the kinetics of cell mobilization into the PB after MI should be analyzed in further studies. It would also be of interest to assess the cell-cycle status of the mobilized cells and to examine whether the different kinds of progenitor cells migrate to the infarcted myocardium. We acknowledge that the correlation between the number of EPC-CFU and the number of CD45⁻34⁺31⁺ cells is missing in this study. However, it is only very recently that Pitchford *et al.* (11) described EPC-CFU assays with murine cells. To our knowledge, until then, all EC-CFU assays had been set up only with human cells (33,34). This is the reason why we did not perform these experiments. The ability of EPC-CFU to form tubules in an *in vitro* EC matrix angiogenesis assay would also be required to prove formally the functionality of EPC.

Our experiments also yielded some apparently contradictory results. We observed a good correlation

between the detection of HPC and MPC by flow cytometry and the number of CFU (GM-CFU and F-CFU, respectively) in the PB. However, for a given cell type, the number of cells detected by FACS analysis was far greater than that obtained by CFU assay, indicating that these two cell populations do not strictly overlap. Also, in the BM, HPC and MPC increased with G-CSF treatment in MI animals, but the number of GM-CFU and F-CFU were decreased compared with those measured in MI animals treated with saline. It is conceivable that inhibitory factors, present in BM but not in PB, could limit the formation of CFU in MI animals treated with G-CSF. This would induce a discrepancy between the count of phenotyped HPC or MPC and that of their CFU counterparts.

The positive impact of G-CSF on cardiac repair after MI observed in animal (7,35) and some clinical (36) studies may be because of the mobilization of SC in the PB and their homing to the heart, where they could differentiate into cardiomyocytes and/or endothelial cells, or locally secrete cytokines and growth factors acting through a paracrine fashion. These types of investigations were beyond the scope of our study, and future studies should examine the relative homing of all three cell populations in the infarcted heart and their impact on the inflammatory process and biochemical response of the injured heart. Indeed, mobilization of EGFP-positive MSC transplanted directly into BM of lethally irradiated mice suggests that the majority of newly formed cardiomyocytes are of MSC origin (7). However, MSC can also differentiate into fibroblasts when localized in a pro-fibroblastic microenvironment (37) and this could contribute to increased rigidity of the heart wall. Cheng *et al.* (38) reported that G-CSF enhanced the migration of MSC from BM to the infarcted heart but without a beneficial effect on cardiac function in rats. Some reports have suggested that HSC do not transdifferentiate into cardiomyocytes after MI (3,5). On the other hand, G-CSF could directly prevent left ventricular remodeling by promoting collagen synthesis (39,40), decreasing cardiomyocyte death (41) and increasing vascular endothelium growth factor expression, Akt activation and NO production in the ischemic region (42–44). G-CSF may also promote neovascularization (9,45,46) or increase the number of resident cardiac cells (47).

The major findings of our study in mice are that (i) the BM is globally affected by MI, with MPC and EPC specifically mobilized from the BM into the PB while HPC are inhibited, and (ii) G-CSF treatment synergistically enhances the mobilization of MPC and EPC and is required for HPC mobilization after acute MI. Our results also show that (i) changes after

simple body injury are not significant and (ii) intense progenitor cell mobilization into the PB may be paralleled by depletion of their BM pools. G-CSF therapy is thus an attractive non-invasive treatment, but the results of clinical trials have been contradictory so far. Decreasing the delay between MI and G-CSF injection, applying advanced imaging techniques and focusing on the long-term effects are all necessary before drawing firm conclusions about G-CSF treatment after cardiac ischemia.

Kuznetsov *et al.* (48) reported the isolation of clonogenic, fibroblast-like cells with osteogenic and adipogenic potential from the blood of four mammalian species, including mice and humans. However, Roberts *et al.* (49) clearly showed that there are differences in the response to G-CSF between strains of mice, indicating that cell mobilization is a complex genetic trait. Some patients also fail to mobilize sufficient numbers of PBSC into the PB after G-CSF injection (poor mobilizers). Lucas *et al.* (50) showed that HSC mobilization depends on the species-specific circadian rhythm, which is inverted in humans compared with mice. Therefore the results found in the present study cannot be extrapolated directly to humans, even if there are similarities between species. Physiologic differences also exist, for example the heart rate is about 600/min in mice versus 80/min in humans, and the murine metabolism is much more raised than that of humans.

Treatment with G-CSF in the setting of MI is a non-invasive therapy that is the focus of current research. It is evident that it is not possible to treat patients 5 days before the occurrence of MI. The results in mice treated prior to MI thus cannot be extrapolated to clinical practice but supply elements for understanding stem cell mobilization following G-CSF therapy. In addition, we also provide data on stem cell mobilization when G-CSF is started after MI.

Acknowledgments

Marie Delgaudine is Télévie Research Assistant and Yves Beguin Research Director of the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium). This work was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (FNRS) and the University of Liège.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, et al. Transcoronary transplantation

- of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007; 100:1234–41.
2. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:700–6.
3. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428:668–73.
4. Fujita J, Mori M, Kawada H, Ieda Y, Tsuma M, Matsuzaki Y, et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair. *Stem Cells.* 2007;25:2750–9.
5. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428:664–8.
6. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 2004;10:494–501.
7. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood.* 2004;104:3581–7.
8. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981–7.
9. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999–1007.
10. Kurdi M, Booz GW. G-CSF-based stem cell therapy for the heart: unresolved issue. A. Paracrine actions, mobilization, and delivery. *Congest Heart Fail.* 2007;13:221–7.
11. Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, Wengner AM, Rankin SM. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell.* 2009;4:62–72.
12. Peister A, Mellad JA, Wang M, Tucker HA, Prockop DJ. Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther.* 2004;11:224–8.
13. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952–8.
14. Rohde E, Bartmann C, Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Linkesch W, et al. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells.* 2007; 25:1746–52.
15. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005;105:199–206.
16. Wójcikowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;110:3213–20.

17. Roberts N, Xiao Q, Weir G, Xu Q, Jahangiri M. Endothelial progenitor cells are mobilized after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:598–605.
18. Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, Song M, Huang L. SDF-1 α involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc Pathol.* 2009.
19. Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sorensen M, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart.* 2006;92:768–74.
20. Dai Y, Ashraf M, Zuo S, Uemura R, Dai YS, Wang Y, et al. Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:607–17.
21. Brehm M, Ebner P, Picard F, Urbien R, Turan G, Strauer BE. Enhanced mobilization of CD34(+) progenitor cells expressing cell adhesion molecules in patients with STEMI. *Clin Res Cardiol.* 2009;98:477–86.
22. Norol F, Merlet P, Isnard R, Sebillon P, Bonnet N, Cailliot C, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood.* 2003;102:4361–8.
23. Ellis SG, Penn MS, Bolwell B, Garcia M, Chacko M, Wang T, et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial. *Am Heart J.* 2006;152:1051–14.
24. Wang Y, Ripa RS, Jorgensen E, Hesse B, Mortensen S, Kastrup J. Mobilization of haematopoietic and non-haematopoietic cells by granulocyte-colony stimulating factor and vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with stable severe coronary artery disease. *Scand Cardiovasc J.* 2007;1–8.
25. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levinsky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:967–76.
26. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;106:984–91.
27. Mansilla E, Marin GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc.* 2006;38:967–9.
28. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2:477–88.
29. Tatsumi K, Otani H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imamura H, et al. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ J.* 2008;72:1351–8.
30. Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica.* 2008;93:908–12.
31. Ripa RS, Haack-Sorensen M, Wang Y, Jorgensen E, Mortensen S, Bindslev L, et al. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2007;116:I24–30.
32. Kong D, Melo LG, Gnechi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation.* 2004;110:2039–46.
33. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzaheh MR, et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol.* 2007;35:1109–18.
34. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* 2007;109:1801–9.
35. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10344–9.
36. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Korber T, et al. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation.* 2005;112:3097–106.
37. Ai G, Su Y, Yan G, Wang M, Liu X, Xu H, et al. [The experimental study of bone marrow mesenchymal stem cells on the repair of skin wound combined with local radiation injury]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2002;82:1632–6.
38. Cheng Z, Liu X, Ou L, Zhou X, Liu Y, Jia X, et al. Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22:363–71.
39. Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner RA. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1662–9.
40. Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Kohno T, Mahara K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;65:446–56.
41. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.* 2005;11:305–11.
42. Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, Hasegawa H, Zou Y, Qin Y, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:1353–9.
43. Takahama H, Minamino T, Hirata A, Ogai A, Asanuma H, Fujita M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006;20:159–65.
44. Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, et al. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:e108–13.
45. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte

10 *M. Delgaudine et al.*

- Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1712–21.
46. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5:434–8.
 47. Brunner S, Huber BC, Fischer R, Groebner M, Hacker M, David R, et al. G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells. *Exp Hematol.* 2008;36:695–702.
 48. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153:1133–40.
 49. Roberts AW, Foote S, Alexander WS, Scott C, Robb L, Metcalf D. Genetic influences determining progenitor cell mobilization and leukocytosis induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1997;89:2736–44.
 50. Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell.* 2008;3:364–6.

Effects of G-CSF on progenitor cell mobilization and heart perfusion and function in normal mice

Running title: G-CSF mobilization and the normal heart.

Word count: abstract 241 words, manuscript 3767 words.

Marie Delgaudine¹, Bernard Lambermont², Patrizio Lancellotti³,
Véronique Roelants^{4,5}, Stéphan Walrand⁵, Jean-Louis
Vanoverschelde⁴, Luc Pierard³, André Gothot¹, Yves Beguin¹.

¹Giga-Research, Hematology Unit, University of Liège, Liège, Belgium.

²Department of Medicine, Medical Intensive Care Unit, University of Liège, Liège, Belgium

³Department of Medicine, Division of Cardiology, University of Liège, Liège Belgium

⁴Catholic University of Leuven, Division of Cardiology, Brussels, Belgium

⁵Catholic University of Leuven, IMRE Unit, Brussels, Belgium

Marie Delgaudine : Conception and design , Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript

Bernard Lambermont, Patrizio Lancellotti, Véronique Roelants, Stéphan Walrand: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript

Jean-Louis Vanoverschelde, Luc Pierard: Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript

André Gothot: Conception and design, Data analysis and interpretation, Final approval of manuscript

Yves Beguin: Conception and design, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of manuscript

Address for correspondence:

Yves Beguin, MD
University of Liège
Department of Hematology
CHU Sart Tilman
4000 Liège
Belgium
Tel +32 - 4 - 366 72 01
Fax +32 - 4 - 366 88 55
E-mail : yves.beguin@chu.ulg.ac.be

Abstract

Background: Mobilization of stem cells and progenitor cells from the bone marrow (BM) into the peripheral blood (PB) by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is being investigated for cardiac regeneration in ischemic heart disease. However, hematopoietic (HPCs), mesenchymal (MPCs) and endothelial (EPCs) progenitor mobilization has not been optimized and the effect of G-CSF on myocardial perfusion and cardiac function in a normal heart has never been studied.

Methods: Normal mice were injected daily for 1-10 days with subcutaneous recombinant human G-CSF. PB and BM were evaluated for HPCs and EPCs by flow cytometry and HPCs and MPCs by hematopoietic (CFU-GM) and mesenchymal (CFU-F) colony assays. Echocardiography, microSPECT imaging, cardiac catheterization and immunohistochemistry were performed in mice treated for 10 days.

Results: HPCs and CFU-GM in PB peaked after 2 days, CFU-F after 4 days and EPCs after 3 days. Thereafter, while HPCs temporally decreased before showing a second peak, EPCs remained detectable only at low levels. In BM, HSCs and CFU-GM did not increase much overall but peaked twice on days 2 and 7. EPCs (peak on day 7) production increased in the BM, but CFU-F formation declined considerably after day 2. G-CSF enhanced myocardial perfusion and vascularisation, but impaired hemodynamic performance of the heart through apparently increased ventricular wall rigidity.

Discussion: G-CSF induces the mobilization of HPCs, EPCs and CFU-F progenitors in PB according to very different patterns, and has a significant impact on perfusion and function of the normal heart.

Key words

G-CSF, mobilization, normal heart, progenitor cells, stem cells.

Abbreviations:

APC: allophycocyanin
Aw: anterior wall
BM: bone marrow
CFU-F: colony-forming units-fibroblasts
CFU-GM: granulocyte macrophage colony-forming units
CO: cardiac output
EDP: end-diastolic pressure
EDV: end-diastolic volume
Ees: ventricular end-systolic elastance
EM-ML: expectation maximization maximum likelihood
EPCs: endothelial progenitor cells
ESP: end-systolic pressure
FACS: fluorescence-activated cell sorting
G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF: Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor
Hct: Hematocrit
HPCs: hematopoietic progenitor cells
HR: heart rate
HSCs: hematopoietic stem cells
Ig: immunoglobulin
IL: interleukin
IVSs: interventricular septal dimension in systole
LV: left ventricular
LVEF: left ventricular ejection fraction
LVIDd: left ventricular end-diastolic internal dimension
LVIDs: left ventricular end-systolic internal dimension
LVPW: left ventricular posterior wall dimension
McAb: monoclonal antibody
MPCs: mesenchymal progenitor cells
MSCs: mesenchymal stem cells
NS: non significant
PB: peripheral blood
PBSC: peripheral blood stem cells
PC: progenitor cells
PV: Pressure-volume
Pw: posterior wall
ROI: region of interest
RT: room temperature
SC: stem cells
SCF: stem cell factor
SD: standard deviation
SDF-1: stromal derived factor-1
Tau: Tau-Logistic method;
Tc: technetium
VLA-4: very late antigen-4
WBC: white blood cells

Introduction

Experiments in animal models²⁹³⁻²⁹⁵ and clinical trials^{296,297} have investigated the potential of stem cells to repair a diseased myocardium. Cells have been mostly obtained from either bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) after mobilization by various pharmacological agents. Among these, Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) has been used most frequently.

Hematopoietic and non-hematopoietic stem and progenitor cells reside mainly in the BM, but few circulate in the PB under physiological conditions and in higher concentration after pharmacological mobilization. Mobilization of hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitor cells (HPCs) into PB can be induced by the administration of G-CSF, Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Interleukin (IL)-3, IL-8, stem cell factor (SCF), the CXCR2 agonist GRO β or the CXCR4 antagonist AMD3100, or combination of these²⁹⁸. G-CSF induces mobilization in a time- and dose-dependent manner, eliciting a gradual increase of HPCs in the PB, peaking after 4 to 7 days in humans. G-CSF-induced peripheral blood stem cells (PBSC) have replaced BM as the major source of HSCs for transplantation, providing faster engraftment with equivalent long-term outcome²⁹⁹. HSCs mobilization is a multistep process involving cytokine-induced functional changes in the adhesion molecule profile of SC, disruption of their adhesive interactions with BM stromal cells, followed by their release, migration and homing³⁰⁰. The role of adhesion molecules, such very late antigen-4 (VLA-4) and P/E selectins, the central function of stromal derived factor-1 (SDF-1) and CXCR4 interactions, and the involvement of proteolytic enzymes such as elastase, cathepsin G and various metalloproteinases have been well established^{301,302}.

The BM is also a reservoir for mesenchymal stem cells (MSCs) and endothelial progenitors (EPCs)³⁰³⁻³⁰⁵. The demonstration of MSCs in PB under physiological conditions or following G-CSF administration remains controversial, but there is growing evidence that these cells can enter the peripheral circulation³⁰⁶⁻³⁰⁸. The mechanisms and kinetics of MSCs

and EPCs mobilization from the BM into the PB are not well characterized. In particular, the patterns of HSCs, MSCs and EPCs mobilization have not been compared and the relationship between their kinetics in PB and BM has not been examined.

On the other hand, the effects of G-CSF administration on myocardial perfusion and hemodynamic performance in the normal heart have never been studied. Whereas the effects of G-CSF in ischemic heart disease has been examined in numerous studies^{309,310}, nothing is known about the potential effects of G-CSF itself on the heart. Therefore, the second aim of our study was to investigate the effects of G-CSF on heart structure and function, using an array of sophisticated techniques including immunohistochemistry, echocardiography, pressure-volume measurements and perfusion imaging.

Material and methods

Animal experiments. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by the Animal Care Ethical Committee of the University of Liège. Female C57Bl/6 mice of 2 months of age were injected daily with recombinant human G-CSF (Neupogen[®]), 50 µg/kg subcutaneously, for 1 to 10 days. Twelve animals were sacrificed each day and their heart, blood (collected from the inferior vena cava) and BM (from both femurs and tibias) were collected. Two other groups of 12 animals each were injected with either saline or G-CSF daily for 10 days, and echocardiography and microSPECT perfusion imaging were performed on day 11 and cardiac catheterization and immunohistochemistry on day 12.

Blood parameters and flow cytometry analysis. White blood cells and BM cells were counted in an ABX Micros 60 automatic cell counter (HORIBA ABX Diagnostics, Antwerp,

Belgium). Blood and BM cells were washed and the supernatant was eliminated. Five μl McAbs anti-CD45, CD34, CD31, or Sca1 (all IgG2b κ from BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) were added to the pellet and cells were incubated 30 minutes at 4°C. Cells were washed and 5 μl Allophycocyanin (APC)-conjugated goat anti-rat Ig were added. After incubation for 30 minutes at 4°C, red cells were lysed with NH_4Cl for 10 minutes and nucleated cells were washed and fixed in PBS 1% formaldehyde. Samples were analyzed on a FACSCANTO (BD Biosciences). A minimum of 400,000 cells were acquired by sample. Hematopoietic (HPCs) and endothelial (EPCs) progenitor cells were evaluated as cells with the $\text{CD45}^+\text{Kit}^+\text{Sca}^+$ and $\text{CD45}^-\text{CD34}^+\text{CD31}^+$ phenotypes, respectively. Absolute cell counts were calculated from the total WBC count and % of positive cells.

Granulocyte macrophage colony-forming units (CFU-GM). Cells were plated at 5×10^4 cells/35 mm dish for BM and 2×10^5 cells/35 mm dish for blood in Methocult[®] GF M3434 media (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) for 16 days. After 2 weeks, numbers of CFU-GM were scored with an inverted microscope with x40 magnification.

Fibroblast colony-forming units (CFU-F). Cells were plated at 5×10^4 cells/25 cm^2 flask for BM and 2×10^5 cells/25 cm^2 flask for blood in DMEM with 10% fetal bovine serum (GIBCO, Merelbeke, Belgium), 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The medium was changed every 3 days for a total of 21 days. Plates were then fixed in methanol and stained with hematoxylin-eosin at room temperature (RT) for 10 minutes. All visible colonies were counted.

Immunohistochemical analyses. Hearts were collected and embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands). The samples were cut to yield 10- μm thick cryostat sections, and fixed in 10% methanol for 10 min at -20°C. Endothelial cells were studied with

a rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) McAb (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) for 60 min at RT, followed by revelation by incubation with a biotin-conjugated rabbit anti-rat McAb (DAKO, Heverlee, Belgium) at 1:400 for 30 min at RT and followed by a streptavidin/HRP-conjugated antibody (DAKO) at 1:500 for 30 min at RT. Imaging was performed with a confocal microscope. The number of CD31-positive arterioles was counted in 8 slides per heart. Nuclei were counter-stained with hematoxylin-eosin.

Immunofluorescence analysis. CFU-F were permeabilized with 0.01% Triton X-100 and studied with goat polyclonal IgG anti-CD73, anti-CD31 or anti-CD45 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany) at 1:500 for 60 min at RT. CFU-F were washed and rhodamine-conjugated rabbit anti-goat polyclonal IgG (Abcam, Cambridge, England) were added. Imaging was performed with a fluorescence microscope.

Echocardiography. Echocardiography was performed using a VIVID 7 echocardiograph and an i13L probe (General Electrics, Horten, Norway). Heated contact gel was applied to maintain stable heart rate. Conventional measurements [left ventricular (LV) diameters, anterior wall (AW) and posterior wall (PW) thickness and thickening] were obtained from grayscale M-mode tracings at the level of the papillary muscles. LV end-systolic and end-diastolic volumes and LV ejection fraction (LVEF) were measured by Teicholtz method. Tissue Doppler images were obtained from the parasternal short-axis view at the midventricular level, at a frame rate of >300 frames/s and a depth of 1 cm. Radial systolic strain was measured over an axial distance of 0.6 mm. The temporal smoothing filters were turned off for all measurements. Peak systolic strain was averaged over three consecutive cardiac cycles.

MicroSPECT imaging. Animals were injected with 173 ± 27 MBq of Tc-99m Sestamibi in the tail vein. To avoid gallbladder accumulation of Tc-99m Sestamibi cleared through the hepatobiliary system, $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ of cholecystikinin was injected intraperitoneally 2 hours after Tc-99m Sestamibi. The animals were scanned 30 minutes later under anesthesia (Ketamine ($50 \text{ mg}/\text{kg}$) and xylazine ($2.5 \text{ mg}/\text{kg}$)) using a microSPECT (Linoview SPECT System, Amsterdam, The Netherlands) during 30 minutes. The characteristics of the microSPECT system have been described elsewhere³¹¹ and it was recently validated for myocardial infarct size measurement in mice by comparison to histology³¹². Data were reconstructed using the expectation maximization maximum likelihood (EM-ML) algorithm without attenuation or resolution correction. Region of interest (ROI) were manually drawn on each transverse slice of the left ventricle. The total number of counts in each ROI was corrected using the microSPECT system sensitivity. In each left ventricle, the percentage of the injected activity was calculated at D0 and D10 and results were expressed as a ratio of mean left ventricular uptake at D10 and D0 (D10/D0).

Hemodynamic measurements. Pressure-volume (PV) loops were obtained under ketamine and xylazine anesthesia by descending a 1.4-F catheter with pressure and conductance sensors (Millar Instrument, Houston, TX) through the right carotid artery into the left ventricle of mice placed on a heating table at 37°C . Before implantation, calibration of the catheter was performed according to the recommendations of the manufacturer. In brief, six cylindrical holes ranging from 13.2 to $172.3 \mu\text{L}$ were filled with fresh heparinized mouse blood. From the measured raw conductance signals, the known cylinder volumes were plotted against the conductance and the regression equation was calculated. To determine parallel conductance in animals, a small hypertonic saline bolus of $10 \mu\text{L}$ was given intravenously. The induced change in conductivity of the blood allows the separation of LV blood volume from parallel conductance due to the surrounding tissues. After instrumentation, data obtained from PV

loops were analysed by the PVAN 3.4 software (Millar Instrument, Houston, TX). LV pressure-volume signals were acquired in steady state to quantify general hemodynamic conditions: heart rate (HR), stroke volume, cardiac output (CO), LV end-diastolic volume (EDV), LVEF, LV end-diastolic (EDP) and systolic pressures (ESP) were assessed. Stroke work was determined as the area of the pressure-volume loop. The time constant of isovolumic relaxation (Tau) was calculated as the slope of the relationship between a linear regression of dP/dt_{max} and pressure. To obtain the slope (Ees) of the end-systolic pressure-volume relationship, a load-independent index of systolic function, pressure-volume loops were also recorded during a gradual preload reduction obtained by gently compressing the inferior vena cava.

Statistical analyses. Data are shown as mean \pm SD. The Gaussian distribution of the population was verified. Comparisons between groups were done using two-tailed Student's *t*-tests or by two-way ANOVA. The between-observers reproducibility was determined by Bland-Altman analysis. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Heart weight (Figure 1) and immunohistochemistry (Figure 2)

Heart weight or heart-to-body weight ratios were not influenced by G-CSF administration. The number of CD31-positive arterioles was higher ($p<0.001$) in mice treated with G-CSF (2.48 ± 0.68) compared to those receiving saline injections (1.90 ± 0.67).

Blood and BM parameters (Figure 3)

Hematocrits increased on day one after starting G-CSF injections and stayed higher than in untreated mice throughout the study. WBC in BM decreased from day 1 through day 4

before bouncing back to intermediate values thereafter, while WBC in PB increased in the first 4 days before returning to baseline levels thereafter, thus mirroring the marrow pattern of evolution.

FACS analysis and CFU assays of progenitor cells (Figure 4)

The number of HPCs in BM peaked twice at days 2 and 7, followed each time by a decline in BM accompanied by a major increase in PB. The number of CFU-GM in BM was also highest on days 2 and 7, each time followed by a decline, and their mobilization in PB was evident after day 1, peaking on days 2-3. Marrow CFU-F decreased considerably after day 2, whereas their numbers in PB increased markedly on day 2 and remained at a constant level for several days, before returning toward baseline values at the end of the experiment. We performed CD45-CD14 or CD45-CD31 double staining on CFU-F colonies. No doubly positive cells were detected. Flow cytometric analysis of cells within the CFU-F showed that these colonies did not contain cells positive for CD34 or CD45, contain 2 % of CD11b⁺ cells, and 60 % of CD106⁺ and 89% of SCA⁺ cells. These colonies thus consisted mainly of MPCs. Marrow EPCs increased steadily through day 7, before returning to baseline thereafter. In the meantime, PB EPCs jumped on day 3 but decreased to intermediate levels from day 5 and on.

MicroSPECT imaging

The ratio of mean left ventricular uptake between D10 and D0 (D10/D0) was 0.90 ± 0.22 in control mice and 1.30 ± 0.41 in G-CSF-treated mice ($p < 0.05$).

Echocardiography

LV dimensions and function were evaluated by echocardiography on day 11, i.e. 24 hours after the last dose of G-CSF or saline (Table 1). HR was comparable in the 2 groups. LV posterior wall dimension (LVPW) ($p < 0.001$) and LVEF ($p < 0.05$) were smaller in G-CSF-

treated mice. Strain in the anterior ($p<0.01$) and posterior wall ($p<0.05$) were reduced after 10 days of G-CSF. The other parameters remained unchanged and heart rates were regular. The inter-observer reproducibility of strain parameters was excellent. There was a strong correlation between the two observers (strain in anterior wall: $r=0.85$; $p<0.001$; strain in the posterior wall: $r=0.87$, $p<0.001$). Blant-Altman analysis revealed that the difference obtained was within 2 SDs of the mean difference for all strain values.

Hemodynamic evaluation (Figure 5)

Hemodynamic data were acquired by conductance catheter on day 12, i.e. 48 hours after the last dose of G-CSF or saline (Table 2). Data were acquired both at baseline and after preload reduction. ESP, EDP and Tau were higher in G-CSF-treated mice ($p<0.05$). Ees was lower after G-CSF therapy, but this difference did not reach statistical significance. The other hemodynamic parameters measured by this technique were not modified by G-CSF administration

Discussion

The major findings of the study were that G-CSF induces the mobilization of HPCs, EPCs and CFU-F progenitors in PB according to very different patterns, and has a significant impact on perfusion and function of the normal heart.

Relatively little is known about the respective kinetics of HPCs, EPCs and CFU-F progenitor mobilization and the impact of G-CSF administration on their pools in the BM in normal mice. We used 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight of human G-CSF, a dose previously used for the mobilization of HSCs in the PB³¹³ that may nevertheless not be optimal.

The number of HPCs in BM remained relatively stable throughout the study except for two peaks occurring on days 2 and 7, followed each time by a major increase in PB. BM CFU-GM showed a similar pattern with the same, though less pronounced, two peaks, also followed by a significant elevation in the PB. Few previous studies have examined the effects of G-CSF on progenitor cells simultaneously in BM and PB and animals were treated for a maximum of 6 consecutive days^{314,315}. Chiang et al. have assessed the impact of G-CSF on BM HSCs in normal donors receiving 5 or 10 µg/kg of G-CSF for 5 consecutive days. They showed that the numbers of nucleated cells and of CD34⁺ cells/ml showed a similar pattern of response in BM and PB, with a peak around day 6³¹⁶. Recently, Lucas et al. highlighted a circadian oscillation of hematopoietic stem cell mobilization³¹⁷.

In our experiments, there was no strict correlation between the numbers of HPCs as identified by flow cytometric analysis and the number of CFU-GM detected. This indicates that many HPCs do not read out in colony assays. This could be explained by two mutually non exclusive hypotheses. On the one hand, culture media used in clonogenic assays may not be suited for the growth of a fraction of the progenitors. On the other hand, G-CSF may interfere with the viability and the clonogenic potential of a subpopulation of HPCs. In particular, mobilized hematopoietic progenitors are released from direct interactions with bone marrow stromal cells, which may contribute to a decreased clonogenic potential.

The kinetics of CFU-F progenitors was different. Blood CFU-F stayed high through day 7 before returning to baseline levels and marrow CFU-F showed a profound reduction in their numbers. Flow cytometric analysis of cells within the CFU-F excluded a contamination by macrophages or endothelial cells.

EPCs showed yet a different pattern of response to G-CSF administration. EPCs numbers in BM increased gradually and were at their maximum on day 7, before waning partially. After a major increase into the PB on days 3 and 4, EPCs mobilization stabilized at much lower, albeit still highly significantly elevated, levels. These observations suggest that

both rapid egress of pre-formed marrow EPCs and a more gradual increase of the formation of EPCs in the BM could account for intense EPCs mobilization into the PB.

We thus demonstrated that the impact of G-CSF on the mobilization of HPCs, EPCs and CFU-F progenitors is time-dependant, involving both increased production in the BM and mobilization into the PB, and displays very different kinetics for the various types of progenitor cells. Whereas HPCs and CFU-F progenitors provide a relatively large window of opportunity for their collection from the PB, EPCs collection would be optimal on days 3-4.

G-CSF induces proliferation and activation of neutrophils and osteoclasts, which in turn secrete various proteases, including elastase, cathepsin G, MMP-9 and MMP-2 that disrupt the SDF-1/CXCR4 axis^{318,319}. G-CSF thus leads to the release of cells characterized by their CXCR4 expression, including HPCs, MPCs and EPCs^{320,321}. Differences observed in the pattern of mobilization of HPCs, EPCs and CFU-F progenitors may therefore be due to differences in adhesive molecule pattern at their surface. Pitchford described a differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow³²². Indeed, HPCs mobilization is maximal when a CXCR4 antagonist is administrated to mice pretreated with G-CSF, while EPCs mobilization is submaximal. In contrast, when mice are pretreated with VEGF, administration of a CXCR4 antagonist stimulates EPCs mobilization and suppressed HPCs mobilization.

Whereas it is well established for HPCs, MPCs and EPCs mobilization in PB remains controversial. Discrepancies may be explained by variations in the source of cells obtained in different studies, differences in culture methods and lack of very specific and unequivocal markers and/or techniques to identify MPCs and EPCs. For example, diverse combinations of markers have been used to identify putative EPCs independently from CD45 expression. However, it is now well established that the use of CD45 is recommended for the enumeration of EPCs by flow cytometry^{323,324}. Colony-forming unit endothelial cells (CFU-EC) assays have not yet been standardized in mice. Nevertheless, the accumulating evidence indicates

that the PB contains EPCs. Their numbers were reduced in patients with cardiovascular disease³²⁵ but they may be mobilized by growth factors such as G-CSF^{326,327}, GM-CSF³²⁸ or erythropoietin³²⁹. Similarly, several studies have reported the detection of MPCs in PB and in particular in normal donors mobilized with G-CSF³³⁰⁻³³³. Mansilla et al. and Zvaifler et al. found cells phenotypically identical to MSCs circulating in normal subjects^{334,335}. Tatsumi et al. did not detect MSCs in murine peripheral blood under physiological conditions but observed a strong mobilization of these cells after 9 days of treatment by G-CSF³³⁶. In addition, Lund et al. identified an increased number of CFU-F in the peripheral blood of volunteers mobilized by G-CSF³³⁷.

Our study is the first to examine the impact of G-CSF therapy on the normal heart. We demonstrated that short-term myocardial perfusion of normal mice is significantly enhanced by G-CSF therapy. By immunohistochemistry, we also confirmed that the number of CD31-positive arterioles increased. Whether this effect is produced by G-CSF acting directly in the heart or follows the homing of EPCs newly formed in the BM and mobilized into the PB remains to be determined.

On the other hand, echocardiography and pressure-volume measurements demonstrated that G-CSF had an impact on LV systolic and diastolic function. By echocardiography, a decreased strain in the anterior and posterior walls indicated a reduced systolic deformation of the myocardium. There was no effect on global systolic function as shown by the invasive hemodynamic approach since the global contractility index, Ees, remained unchanged. However, data obtained from pressure-volume loops evidenced an impaired diastolic function. Tau, which measures the early active relaxation process, increased, indicating an abnormal LV relaxation. LV end-diastolic pressure also increased and in the absence of any increase in LV end-diastolic volume this suggests a lower myocardial compliance in G-CSF-treated mice. All these findings concur to suggest that G-CSF exerts a

rigidifying effect on the ventricular wall that may impair left ventricular diastolic function. Higher doses could be tested in future experiments. to determine whether superior concentrations of G-CSF would increase these phenomena. The mechanisms remain to be elucidated. Working hypotheses include a direct effect of G-CSF on the myocardium, homing to the heart of mobilized MPCs, or a local inflammatory effect induced by excess neutrophils or other cells. Indeed, G-CSF could promote collagen synthesis^{338,339}, MSCs could differentiate into fibroblasts when localized in a pro-fibroblastic microenvironment^{340,341} and acute tissue injury has also been described in the lung after the use of G-CSF³⁴².

Our study has some limitations. Heart rates were low despite anesthesia with ketamine at 50 mg/kg and xylazine at 2.5 mg/kg, doses usually associated with high, stable heart rates, high fractional shortening, and limited effects on LV inner dimension at end of diastole³⁴³. Other anesthesia protocols with pentobarbital (30 mg/kg) or isoflurane had the same impact on heart rate. Nevertheless, the heart rate was quite reproducible in the 2 groups of experimental animals.

Results found in the present study cannot be directly extrapolated to humans even if there are similarities between species. For example, Kuznetsov et al. reported the isolation of clonogenic, fibroblast-like cells with osteogenic and adipogenic potential from the blood of four mammalian species, including mice and humans. Although the phenotypic profile of stem cells are quite similar among species, the expression of markers can vary³⁴⁴. Lucas et al. also showed that HSCs mobilization depends on species-specific circadian rhythm that was inverted in humans compared to the mouse³⁴⁵. Physiological differences also exists, for example the heart rate is about 600/min in mice versus 80/min in humans, and murine metabolism is much more raised than that of humans. Furthermore, hemodynamic results obtained in mice may not be transposed to the response or data recorded in humans. No negative hemodynamic effects of G-CSF have been noted in patients or normal individuals

during or after G-CSF administration³⁴⁶ and recent reviews do not suggest negative hemodynamic consequences, such as impaired relaxation or reduced contractility, of G-CSF in adults following cardiac injury³⁴⁷. However, differences between control and G-CSF treated mice are probably not the consequence of reactive antibodies generated towards the human protein, because previous studies have shown that this phenomenon appears only after repeated cycles of G-CSF administration³⁴⁸.

These new observations may have significance for the projected use of G-CSF in cardiovascular regenerative medicine. Further research should examine a number of important questions. Are the observed effects of G-CSF on the perfusion of the heart and rigidity of the ventricular wall reversible after cessation of G-CSF therapy? To what degree are these consequences of G-CSF use also encountered after myocardial infarction? Are these observations the result of direct effects of G-CSF on the myocardium, blood vessels or other cell types in the heart, or are they due to homing of various progenitor cells mobilized into the PB from the BM? Are these results in mice relevant to humans? In the meantime, caution should be exerted and G-CSF use for cardiologic purposes should only be carried out in the setting of clinical trials with emphasis on safety together with efficacy endpoints.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium) and from the University of Liège. Marie Delgaudine is Télévie Research Assistant, Véronique Roelants Research Physician and Yves Beguin Research Director of FNRS.

References

1. Cogle CR, Madlambayan GJ, Hubsher G, Beckman C, Speisman R, Tran-Son-Tay R, et al. Marrow cell therapies for cardiovascular diseases. *Exp.Hematol.* 2008; 36: 687-694.
2. Pelacho B, Luttun A, Aranguren XL, Verfaillie CM, Prosper F. Therapeutic potential of adult progenitor cells in cardiovascular disease. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 2007; 7: 1153-65.
3. Ruvinov E, Dvir T, Leor J, Cohen S. Myocardial repair: from salvage to tissue reconstruction. *Expert.Rev.Cardiovasc.Ther.* 2008; 6: 669-86.
4. Vassalli G, Vanderheyden M, Renders F, Eeckhout E, Bartunek J. Bone marrow stem cell therapy for cardiac repair: challenges and perspectives. *Minerva Cardioangiol.* 2007; 55: 659-67.
5. Wollert KC. Cell therapy for acute myocardial infarction. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2008; 8: 202-10.
6. Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr.Opin.Hematol.* 2008; 15: 285-92.
7. Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, et al. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 353-7.
8. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood* 2001; 98: 2403-11.
9. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, et al. Stem cell mobilization. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2003; 419-37.

10. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp.Hematol.* 2002; 30: 973-81.
11. Kim S, von Recum H. Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008; 14: 133-47.
12. Levesque JP, Winkler IG, Larsen SR, Rasko JE. Mobilization of bone marrow-derived progenitors. *Handb.Exp.Pharmacol.* 2007; 3-36.
13. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med* 2007; 140: 67-81.
14. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 2007; 25: 69-77.
15. Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica* 2008; 93: 908-12.
16. Wang Y, Ripa RS, Jorgensen E, Hesse B, Mortensen S, Kastrup J. Mobilization of haematopoietic and non-haematopoietic cells by granulocyte-colony stimulating factor and vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with stable severe coronary artery disease. *Scand.Cardiovasc.J* 2007; 41: 397-404.
17. Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK, Tleyjeh IM, Hornung CA, Dawn B. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am.Heart J* 2008; 156: 216-26.
18. Ripa RS, Kastrup J. G-CSF therapy with mobilization of bone marrow stem cells for myocardial recovery after acute myocardial infarction--a relevant treatment? *Exp.Hematol.* 2008; 36: 681-6.

19. Walrand S, Jamar F, de Jong M, Pauwels S. Evaluation of novel whole-body high-resolution rodent SPECT (Linoview) based on direct acquisition of linogram projections. *J.Nucl.Med.* 2005; 46: 1872-80.
20. Roelants V., Delgaudine M., de Leval L., Beguin Y., Vanovershelde J., Jamar F., et al. Evaluation of the Novel High-Resolution Rodent Linoview SPECT for Myocardial Perfusion Imaging of Mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; S244.
21. Bungart B, Loeffler M, Goris H, Dontje B, Diehl V, Nijhof W. Differential effects of recombinant human colony stimulating factor (rh G-CSF) on stem cells in marrow, spleen and peripheral blood in mice. *Br.J.Haematol.* 1990; 76: 174-9.
22. Varas F, Bernad A, Bueren JA. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood* 1996; 88: 2495-501.
23. Chiang KY, Lamb L, Clark J, Worthington-White D, Rich I, Henslee-Downey PJ. Assessment of G-CSF stimulated BM hematopoietic stem cells in normal donors. *Cytotherapy.* 2002; 4: 55-63.
24. Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 364-6.
25. Fibbe WE, Hamilton MS, Laterveer LL, Kibbelaar RE, Falkenburg JH, Visser JW, et al. Sustained engraftment of mice transplanted with IL-1-primed blood-derived stem cells. *J.Immunol.* 1992; 148: 417-21.
26. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; 98: 1289-97.

27. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109: 625-37.
28. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner.Res.* 2003; 18: 1404-18.
29. Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, Wengner AM, Rankin SM. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 62-72.
30. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzaheh MR, et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp.Hematol.* 2007; 35: 1109-18.
31. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, et al. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2007; 27: 1572-9.
32. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ.Res.* 2001; 89: E1-7.
33. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; 98: 10344-9.
34. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-8.
35. Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate

- reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation* 2003; 108: 2918-25.
36. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; 103: 921-6.
 37. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37: 967-76.
 38. Tatsumi K, Otani H, Sato D, Enoki C, Iwasaka T, Imamura H, et al. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. *Circ.J* 2008; 72: 1351-8.
 39. Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S, Bergamin N, D'Aurizio F, Verardo R, et al. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circ.Res.* 2009; 104: 1225-34.
 40. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009; 106: 984-91.
 41. Mansilla E, Marin GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant.Proc.* 2006; 38: 967-9.
 42. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000; 2: 477-88.
 43. Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner RA. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2005; 46: 1662-9.

44. Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, Maekawa Y, Kohno T, Mahara K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* 2005; 65: 446-56.
45. Ai G, Su Y, Yan G, Wang M, Liu X, Xu H, et al. [The experimental study of bone marrow mesenchymal stem cells on the repair of skin wound combined with local radiation injury]. *Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.* 2002; 82: 1632-6.
46. Lee CH, Moioli EK, Mao JJ. Fibroblastic differentiation of human mesenchymal stem cells using connective tissue growth factor. *Conf.Proc.IEEE Eng Med Biol.Soc.* 2006; 1: 775-8.
47. Arimura K, Inoue H, Kukita T, Matsushita K, Akimot M, Kawamata N, et al. Acute lung Injury in a healthy donor during mobilization of peripheral blood stem cells using granulocyte-colony stimulating factor alone. *Haematologica* 2005; 90: ECR10.
48. Xu Q, Ming Z, Dart AM, Du XJ. Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2007; 34: 499-507.
49. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153: 1133-40.
50. Moog R. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells. *Curr.Stem Cell Res.Ther.* 2006; 1: 189-201.
51. Kang S, Yang Y, Li CJ, Gao R. Effectiveness and tolerability of administration of granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin.Ther.* 2007; 29: 2406-18.
52. de Kruijf EJ, van Pel M, Hagoort H, Kruysdijk D, Molineux G, Willemze R, et al. Repeated hematopoietic stem and progenitor cell mobilization without depletion of the bone marrow stem and progenitor cell pool in mice after repeated administration of recombinant murine G-CSF. *Hum.Immunol.* 2007; 68: 368-74.

Table 1: Echocardiographic parameters as evaluated on day 11, i.e. 24 hours after the last of 10 daily doses of G-CSF or saline (n=12).

	Saline	G-CSF	P value
Heart rate (beats/min)	236 ± 92	271 ± 51	NS
LVIDd (mm)	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.2	NS
LVIDs (mm)	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.4	NS
LVPWd (mm)	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	p<0.001
IVSs (mm)	0.88 ± 0.10	0.86 ± 0.10	NS
LVEF (%)	66.1 ± 3.2	59.9 ± 3.7	p<0.05
CO (µl/sec)	217 ± 71	208 ± 88	NS
Strain aw (%)	34.5 ± 6.8	21.8 ± 4.4	p<0.01
Strain pw (%)	29.8 ± 8.5	21.2 ± 6.5	p<0.05

Abbreviations: LVIDd = left ventricular end-diastolic internal dimension; LVIDs = left ventricular end-systolic internal dimension; LVPWd = left ventricular posterior wall dimension in diastole; IVSs = interventricular septal dimension in systole; LVEF = left ventricular ejection fraction; CO = cardiac output; Strain aw = strain in anterior wall; Strain pw = strain in the posterior wall

Table 2: Hemodynamic parameters as evaluated on day 12, i.e. 48 hours after the last of 10 daily doses of G-CSF or saline (n=12).

	Saline	G-CSF	P value
Heart rate (beats/min)	258 ± 60	282 ± 74	NS
ESP (mm Hg)	85.2 ± 9.4	97.2 ± 11.0	p<0.01
EDP (mm Hg)	15.3 ± 10.5	31.6 ± 5.2	p<0.01
EDV (μL)	54.7 ± 38.1	68.9 ± 24.0	NS
Stroke volume (μL)	28.1 ± 10.5	26.3 ± 13.9	NS
Stroke work (mmHg*μl)	1636 ± 764	1589 ± 643	NS
Tau (msec)	13.2 ± 2.8	23.6 ± 14.3	p<0.05
Ees (mmHg/ml)	2.22 ± 1.23	1.70 ± 1.51	NS

Abbreviations: ESP = left ventricular end-systolic pressure; EDP = left ventricular end-diastolic pressure; EDV = left ventricular end-diastolic volume; Tau = Tau-Logistic method; Ees = ventricular end-systolic elastance.

Legends to the figures

Figure 1: Heart weight

Heart weight (mg) and heart-to-body weight ratio (mg/mg) in mice before (day 0) and after 1 to 10 days of G-CSF therapy (NS).

Figure 2: CD31-positive arterioles

Immunohistochemical analyses of CD31-positive arterioles in the heart of (A) control mice and (B) G-CSF treated animals (Magnification 50X).

Figure 3: Blood parameters

Hematocrit (Hct), as well as white blood cell (WBC) count in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) in mice before (day 0) and after 1 to 10 days of G-CSF therapy. P values are given for comparisons with day 0 values: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 4: Progenitor cells

Hematopoietic progenitor cells (HPCs), and endothelial progenitor cells (EPCs), as well as CFU-GM and CFU-F, in peripheral blood of mice before (day 0) and after 1 to 10 days of G-CSF therapy.

Figure 5: PV loops

Representative PV loops in G-CSF treated mice (A) during baseline state and (B) after preload reduction obtained by gently compressing the inferior vena cava.

Figure 1

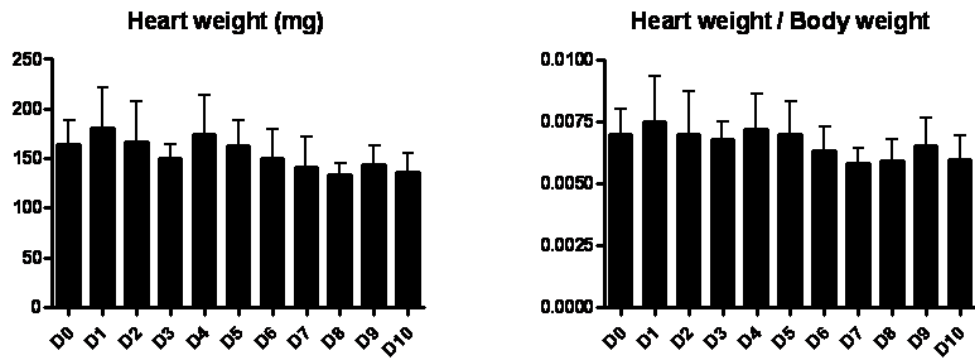
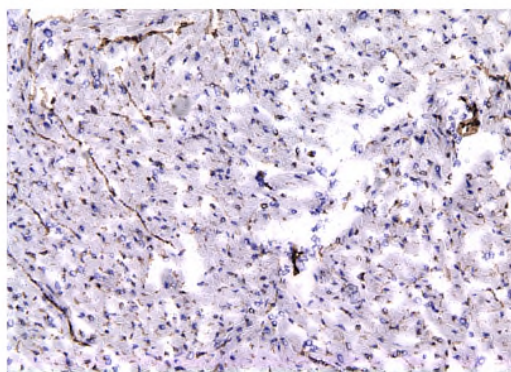


Figure 2

A.



B.

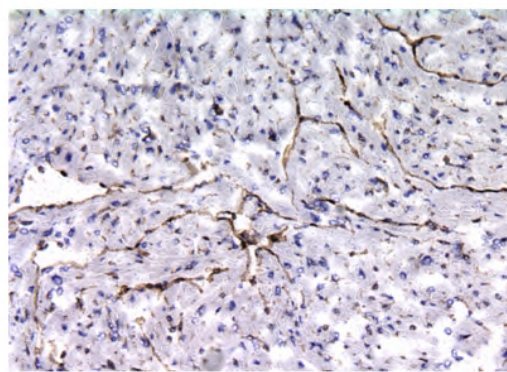


Figure 3

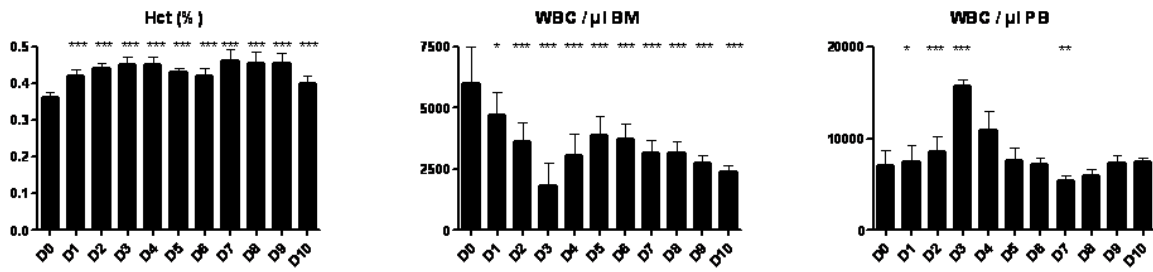


Figure 4

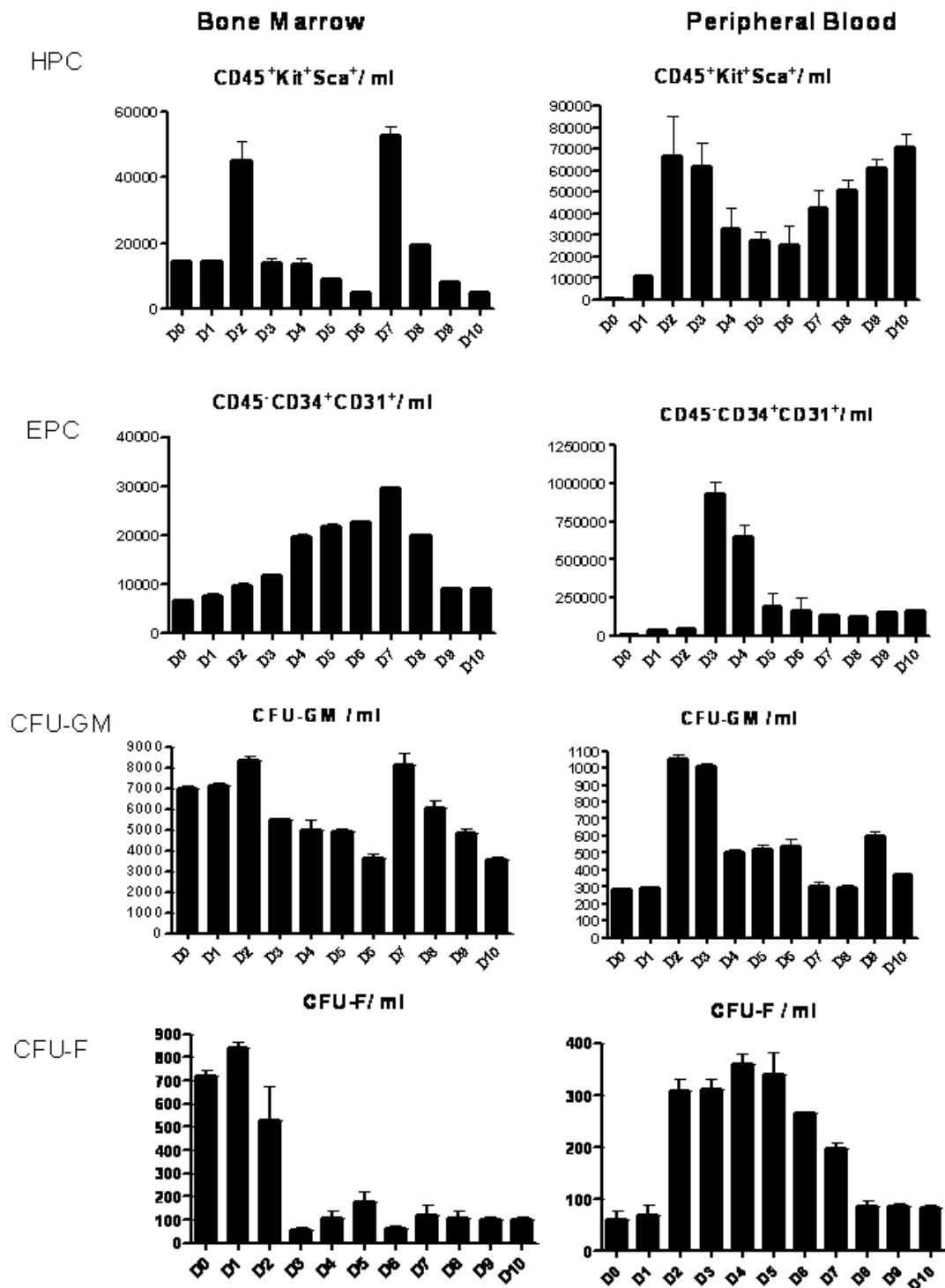
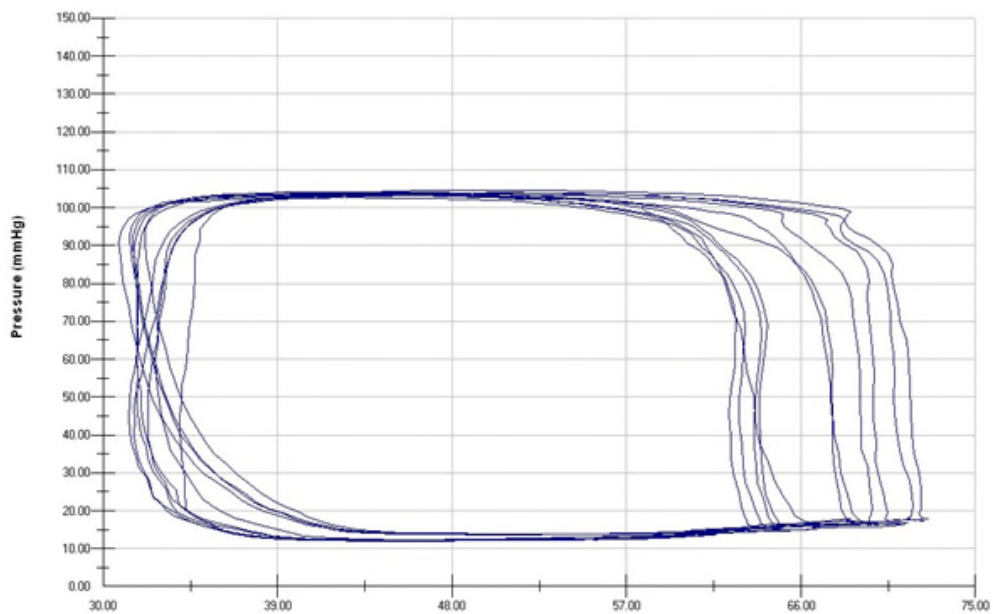


Figure 5

A.



B.

$$\text{ESPVR: } P_{es} = 2.362 \cdot (V_{es} - 2.123)$$
$$\text{EDPVR: } P_{ed} = 0.222 \cdot V_{ed} + 3.612$$

