



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

Archive ouverte UNIGE

<https://archive-ouverte.unige.ch>

Thèse

2006

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Cardiomyocytes derivés à partir de cellules souches embryonnaires ou adultes : leçons tirées des modèles "in vitro"

Bettiol, Esther

How to cite

BETTIOL, Esther. Cardiomyocytes derivés à partir de cellules souches embryonnaires ou adultes : leçons tirées des modèles 'in vitro'. Doctoral Thesis, 2006. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:451

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:451>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:451](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:451)

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Section de Médecine Fondamentale

Département de Pathologie et Immunologie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Karl-Heinz Krause

et du Docteur Marisa Jaconi

**CARDIOMYOCYTES DERIVÉS À PARTIR DE
CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES OU ADULTES :
LEÇONS TIRÉES DES MODÈLES *IN VITRO***

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Esther BETTIOL
de
Chêne-Bougeries (GE)

Thèse n°10492

Genève
2006



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DE MÉDECINE

DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Madame Esther BETTIOL

originaire de Chêne-Bougeries (GE)

Intitulée :

**CARDIOMYOCYTES DERIVES A PARTIR DE
CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES OU ADULTES :
LECONS TIREES DES MODELES *IN VITRO***

La Faculté de médecine, sur le préavis de Monsieur Karl-Heinz KRAUSE, professeur ordinaire au Département de pathologie et immunologie, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 8 décembre 2006

Thèse n° **10492**



Jean-Louis Carpentier
Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

Je dédie cette thèse

à ma famille, à mes parents Jean-Pierre et Martine, à ma sœur Evelore et à mon frère Emilien.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
A. Remerciements	5
B. Note préliminaire	5
C. Liste des abréviations	6
D. Résumé	8
E. Introduction	9
E.1 Mécanismes de différenciation cardiaque <i>in vivo</i>	10
E.2 Cellules souches embryonnaires et adultes: définitions	12
F. Cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires	13
F.1 Cellules embryonnaires carcinomateuses de souris	14
F.2 Cellules souches embryonnaires de souris	19
F.3 Cellules souches embryonnaires humaines	27
F.4 Leçons tirées des modèles de cellules souches embryonnaires	30
G. Cellules souches adultes	32
G.1 Cellules souches adultes isolées de la moelle osseuse	32
G.1.1 Cellules souches hématopoïétiques	33
G.1.2 Cellules souches mésenchymateuses	34
G.1.3 Cellules progénitrices multipotentes	36
G.2 Cellules souches du muscle squelettique	37
G.3 Cellules souches cardiaques	38
G.4 Leçons tirées des modèles de cellules souches adultes	40
H. Conclusion	41
I. Références bibliographiques	42

A. Remerciements

Je remercie les personnes qui ont participé à l'écriture de ce texte pour leur relecture critique et leurs conseils utiles, ainsi que pour leur soutien précieux durant mes années de thèse : ma co-directrice de thèse et superviseur le Dr Marisa Jaconi et mon co-directeur de thèse le Professeur Karl-Heinz Krause, ainsi que le Dr Sophie Clément.

Je remercie également les membres actuels et passés du groupe Jaconi pour leur aide et soutien: Michael Stouffs, le Dr Mathieu Hauwel, Madeleine Zufferey, Marie-Claude Belkouch, le Dr Jian Li, Lasta Kocjancic-Curty, les Dr Qing He, Bei Wang, Xiangdong Yang, Adila Azhati et Hairong Fan, Paula Borel, Stéphanie Pascarella, Sandy Kampf, ainsi que tous les membres du groupe Krause dont, en particulier, les Dr Karen Bedard pour sa relecture critique du texte, les Dr Lena Serrander, Charles-Edward Jefford et Anis Feki, David Suter, Olivier Plastre, Térése Laforge, Aurélie Caillon, Stéphanie Julien, Diderik Tirefort et Hélène Gfeller-Tillman.

Finalement, pour leur soutien, leur patience et leur amitié, je remercie infiniment mes amis: Séverine et Radu Sarbu, Christine Delaloye et Gaël Kertudo, Caroline Bourquin, Mathieu Bondallaz, Delphine Bieri, Catherine Pereira, Muriel Meunier, Nadège Bonnet, ainsi que ma famille et en particulier Martine Bettiol-Destraz, Jean-Pierre Bettiol et Evelore Bettiol.

Je suis aussi reconnaissante à l'Académie Suisse des Sciences Médicales pour son soutien financier (Bourse MD-PhD N° 14/03).

B. Note préliminaire

La présente thèse est actuellement sous presse pour publication dans le volume 157 du journal *Reviews of Physiology, Pharmacology and Biochemistry* en version anglaise et intitulée « Embryonic and adult stem cell-derived cardiomyocytes: lessons from *in vitro* models » par E. Bettiol, S. Clement, K.H. Krause et M.E. Jaconi.

C. Liste des abréviations

ANP	peptide atrial natriurétique
AR	acide rétinoïque
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
BSA	albumine de sérum bovin
CAMKs	kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline
CE	corps embryoïdes
CEC	cellules embryonnaires carcinomateuses
CECs	cellules embryonnaires carcinomateuses de souris
CRT	calréticuline
CSE	cellules souches embryonnaires
CSEh	cellules souches embryonnaires humaines
CSEs	cellules souches embryonnaires de souris
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CSM	cellules souches mésenchymateuses
DMSO	dimethyl-sulfoxyde
ESTs	Expressed Sequence Tags
FBS	Fetal Bovine Serum ou sérum bovin fœtal
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	glycophosphatidylinositol
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cells ou cellules souches adultes multipotentes
MDRG	multi-drug resistance gene
ME	microscopie électronique
MEFs	mouse embryonic fibroblasts ou fibroblastes embryonnaires de souris
MHC	chaînes lourdes de myosine ou Myosin Heavy Chain
MIDORI	Myocytic Induction/Differentiation ORIGINator

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
mlc	chaîne légère de myosine
NO	oxyde nitrique
NOS	Nitric Oxide Synthase
PA	potentiel d'action
PI-3-kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-kinase
PKC	Protéine Kinase C
ROS	Reactive Oxygen Species ou radicaux libres
SHH	Sonic hedgehog
SP	Side Population
T3	triiodothyronine
TGF β	facteur de croissance transformant β

D. Résumé

Afin de trouver de nouveaux traitements contre l'insuffisance cardiaque, la recherche biomédicale a centré ses efforts, pendant des années, sur le soutien des cardiomyocytes restants qui sont déjà surchargés. Récemment, le concept de thérapie cellulaire comme possibilité de traitement des maladies cardiaques a permis d'ouvrir une nouvelle direction de recherche. Ce concept implique la génération de cardiomyocytes *in vitro* et leur injection dans le myocarde afin d'en améliorer la fonction. Ces cellules cardiaques pourraient être obtenues à partir de cellules souches embryonnaires ou adultes. Les connaissances que nous avons des mécanismes fondamentaux de différenciation cardiaque, qui furent d'abord étudiés sur des modèles animaux *in vivo*, peuvent maintenant être complétées en utilisant des modèles de cardiogenèse *in vitro*, qui comprennent les cellules souches carcinomateuses de souris, les cellules souches embryonnaires de souris et, depuis peu, les cellules souches embryonnaires humaines. D'un autre côté, des études suggérant l'existence de cellules souches cardiaques dans le cœur adulte et suggérant également le potentiel de cellules souches adultes présentes dans la moelle osseuse ou le muscle squelettique de se différencier en cellules de phénotypes inattendus posent la question de la possible utilisation de ces cellules pour la thérapie cellulaire cardiaque. Dans cette revue de la littérature, nous avons comparé les spécificités propres des cellules souches embryonnaires et adultes concernant leur potentiel de différenciation en cardiomyocytes et nous résumons ce que ces modèles *in vitro* nous ont appris sur les mécanismes de différenciation cardiaque.

E. Introduction

Le cœur est un organe fascinant qui a toujours éveillé un grand intérêt. Traditionnellement représenté comme étant l'endroit où se trouvent les sentiments, le cœur est cependant devenu l'endroit d'une des pathologies les plus communes et meurtrières de notre temps et, donc, un des plus grands défis de la médecine moderne. Les maladies cardiovasculaires sont une des causes principales de morbidité et de mortalité dans les pays développés et les pays en voie de développement. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes développementaux cardiaques est devenue indispensable, non seulement dans un but de recherche fondamentale et de connaissances de base, mais aussi afin de permettre le développement de nouveaux traitements.

Contrairement à certains autres organes comme le foie, la peau ou l'os, le muscle cardiaque n'est pas capable de se régénérer à la suite d'une blessure. Des études poussées sur des cœurs fœtaux et adultes de mammifères, ainsi que sur des cardiomyocytes isolés, ont été essentielles par le passé pour permettre le développement de traitements pharmacologiques et chirurgicaux de l'insuffisance cardiaque. Cependant, ces traitements n'agissent que sur les cardiomyocytes restants qui sont déjà soumis à une surcharge de travail mécanique, ce qui mènent inévitablement à l'insuffisance cardiaque terminale.

La thérapie cellulaire cardiaque, aussi appelée médecine régénérative du cœur, se profile comme une manière d'aider un cœur lésé en implantant de nouvelles cellules saines qui remplaceront les cardiomyocytes morts et pourront ainsi régénérer le myocarde. La possibilité pour des cellules cardiaques exogènes de survivre après implantation dans le myocarde a été démontrée, mais des études plus poussées sont nécessaires afin de déterminer si les cellules greffées sont fonctionnelles, couplées électriquement avec le myocarde environnant et capables d'une performance contractile. La meilleure source de cellules n'est pas encore déterminée avec certitude non plus et de nombreuses équipes de recherche essaient actuellement de répondre à ces questions en effectuant des études *in vivo* et *in vitro*. Les cardiomyocytes produits *in vitro* sont une source prometteuses, mais afin d'en obtenir une grande quantité pour la transplantation et d'assurer qu'ils ont une fonction correcte, une connaissance approfondie des mécanismes fondamentaux de différenciation cardiaque est nécessaire. Dans cette revue, nous décrivons les différents types de cellules souches capables de se différencier en cardiomyocytes *in vitro* et résumons plus en détails ce que ces modèles de différenciation *in vitro* nous ont appris sur la cardiogenèse.

E.1 Mécanismes de différenciation cardiaque *in vivo*

In vivo, les cardiomyocytes dérivent du mésoderme latéral. Des études conduites sur la drosophile et sur des embryons d'amphibiens ou de poulet nous ont permis de mieux comprendre certains des mécanismes menant à la différenciation cardiaque ou cardiogénèse. Le rôle prépondérant de facteurs de croissance et morphogènes qui ont un effet pro- ou anti-cardiogénique est crucial dans ce processus. Ces facteurs sont sécrétés durant l'embryogenèse par les cellules d'origine endodermique, mésodermique ou ectodermique qui entourent le mésoderme cardiogénique. Ils activent des cascades de signaux qui induisent l'expression de facteurs de transcription cardiaques. Ceux-ci vont déclencher le programme d'expression de tous les gènes menant au développement d'un cardiomyocyte fonctionnel (Brand 2003; Fishman and Chien 1997; Srivastava and Olson 2000). La Figure 1 résume les résultats obtenus grâce à ces modèles. L'identification des effets complexes de ces facteurs de croissance, les cascades de signaux qu'ils activent ou inhibent et les gènes cibles dont l'expression est déclenchée par ces signaux est très importante pour permettre un jour de pouvoir spécifiquement diriger la différenciation de cellules souches en cardiomyocytes.

Des facteurs pro-cardiogéniques cruciaux sont sécrétés par l'endoderme (Lough and Sugi 2000) comme plusieurs membres de la superfamille du facteur de croissance transformant β (TGF β). Par exemple, le traitement d'explants d'embryon de *Xenopus Laevis* avec de l'Activine A peut induire la différenciation cardiaque (Logan and Mohun 1993). De manière similaire, l'application simultanée des facteurs Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) et Fibroblast Growth Factor-4 (FGF-4) peut déclencher la cardiogénèse à partir de mésoderme non-précardiaque d'embryons de poulet (Lough 1996). Cripto, un facteur exprimé dans le mésoderme précoce de souris (Dono 1993), a également un effet permissif en permettant à Nodal, un autre membre de cette superfamille du TGF β , de se lier à son récepteur (Schier and Shen 2000).

La voie Wnt/ β -caténine joue aussi un rôle important *in vivo*. La voie canonique, impliquant Wnt1, 3 et 8 et qui conduit à l'activation de la β -caténine, a un effet anti-cardiogénique. En effet, le knock-out conditionnel du gène de la β -caténine dans l'endoderme définitif induit une expression ectopique de BMP-2 et la formation de cœurs multiples (Lickert 2002). Certains antagonistes de la voie canonique comme Dickkopf-1 ou Crescent jouent un rôle indirect dans l'induction cardiaque via le facteur de transcription Hex (Foley and Mercola 2005). A l'opposé, la voie non-canonique, impliquant Wnt11 et activant la signalisation dépendante de la Protéine Kinase C (PKC), favorise la cardiogénèse. Des études sur les embryons de poulet ont mis en évidence un rôle positif

de Wnt11 sur la différenciation cardiaque, car ce facteur est capable d'induire une cardiogenèse ectopique (Eisenberg and Eisenberg 1999; Eisenberg 1997).

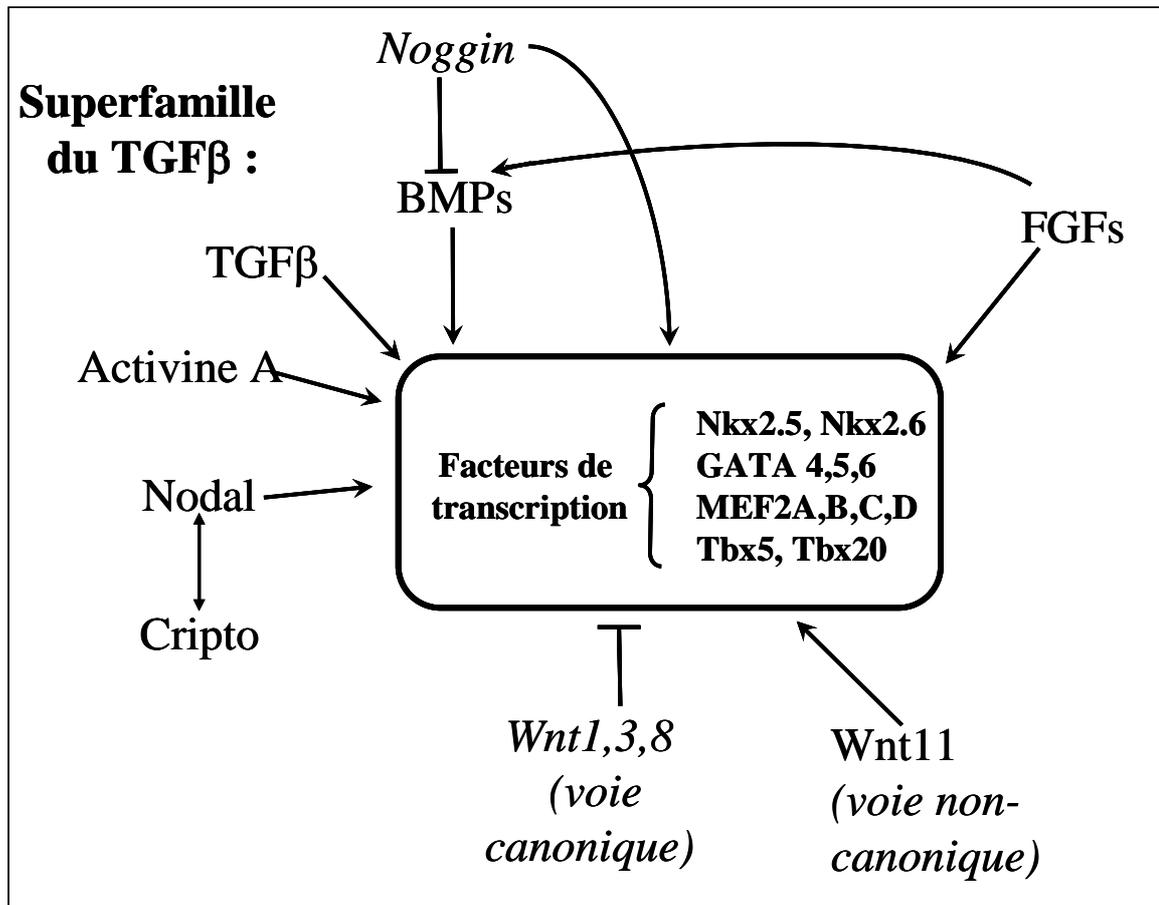


Figure 1. Schéma général des différentes familles de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation cardiaque. Les résultats résumés dans cette figure ont été obtenus sur des modèles animaux comme la drosophile, la souris et sur des embryons d'amphibiens et de poulet. L'activation des voies de signalisation en aval induit l'expression de facteurs de transcription de type Nkx, MEF2, GATA et T-box.

Dans les cellules cardiaques précurseurs, des signaux activateurs ou inhibiteurs (facteurs de croissance, morphogènes, peptides) déclenchent et modulent l'expression d'un réseau complexe de facteurs de transcription. Les familles de facteurs de transcription Nkx (Evans 1999), MEF2 (Black and Olson 1998), GATA (Molesting 2000) et T-box (Ryan and Chin 2003) jouent toutes un rôle dans la différenciation. Des membres de différentes familles peuvent interagir entre eux ou influencer réciproquement leurs taux d'expression (Durocher 1997; Morin 2000). Plusieurs de ces facteurs sont principalement exprimés dans le cœur, mais, sur toute la durée du développement, aucun d'entre eux n'est uniquement exprimé que dans les cellules cardiaques.

E.2 Cellules souches embryonnaires et adultes: définitions

Les cellules souches possèdent deux propriétés principales: la faculté de proliférer en restant indifférenciées et la faculté de se différencier quand certains signaux déclenchent le processus. Elles sont classifiées en fonction de leur potentiel de différenciation. Si une cellule souche peut produire des cellules différenciées dérivant des trois feuillets embryonnaires, elle est définie comme pluripotente. Si elle peut produire plusieurs types de cellules dérivant d'un seul feuillet embryonnaire, elle est définie comme multipotente. Si le potentiel de différenciation est limité à un seul type de cellules, la cellule souche est alors appelée unipotente.

Les lignées de cellules souches dérivées à partir d'embryons, comme les cellules embryonnaires carcinomateuses (CEC) et les cellules souches embryonnaires (CSE) sont pluripotentes. Ces lignées représentent un outil très puissant pour étudier *in vitro* les processus développementaux, comme par exemple la spécification des feuillets embryonnaires ou la différenciation précoces de cellules cardiaques (Gadue 2005; Keller 2005). D'un autre côté, les cellules souches adultes, qui se trouvent dans de nombreux organes du corps et sont responsables du maintien et de la réparation des organes, sont multipotentes ou unipotentes.

Les cardiomyocytes peuvent être dérivés de différents types de cellules souches adultes ou embryonnaires (Figure 2). Dans cette revue, nous allons donner une vue d'ensemble des différentes études démontrant le potentiel cardiogénique de cellules souches embryonnaires ou adultes. Concernant ces dernières, nous nous attacherons surtout aux cellules souches hématopoïétiques, mésenchymateuses, cardiaques et du muscle squelettique.

Les cellules souches en tant que modèle de différenciation *in vitro* offrent la possibilité de connaître mieux les mécanismes fondamentaux du développement. Leur étude n'ouvre pas seulement des portes à de potentiels traitements par thérapie cellulaire, mais permet aussi d'augmenter nos connaissances en biologie développementale, cellulaire et moléculaire.

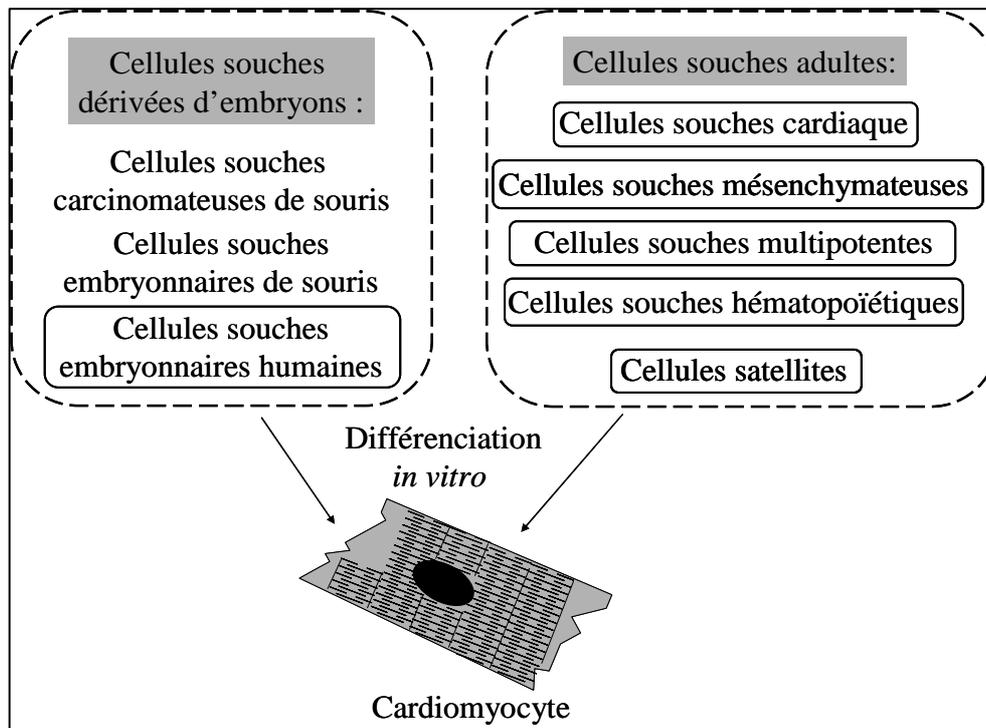


Figure 2. Deux types de cellules souches peuvent se différencier en cardiomyocytes *in vitro*: des cellules souches dérivées d'embryons et des cellules souches adultes. Les types cellulaires encadrés pourraient être utilisés dans le futur pour la thérapie cellulaire.

F. Cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires

Plusieurs modèles de cellules souches dérivées d'embryons sont disponibles pour l'étude de la différenciation cardiaque *in vitro*. Les cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris (CECs), les cellules souches embryonnaires de souris (CSEs) et les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) sont dérivées d'embryons précoces et sont pluripotentes. Lorsqu'elles sont placées dans des conditions spécifiques, ces trois types cellulaires peuvent se différencier spontanément en cardiomyocytes qui se contractent spontanément et peuvent être étudiés *in vitro*, rendant possible l'étude de l'expression de facteurs de transcription, de la myofibrillogénèse et des caractéristiques électrophysiologiques par exemple. De plus, les propriétés spécifiques des cardiomyocytes embryonnaires peuvent être comparées aux propriétés de cellules cardiaques néonatales ou adultes. Finalement, ces modèles peuvent permettre la découverte de nouveaux gènes jouant un rôle dans la différenciation cardiaque ou de nouvelles manières de pousser des cellules pluripotentes dans la voie de différenciation cardiaque spécifiquement.

F.1 Cellules embryonnaires carcinomateuses de souris

Les cellules souches embryonnaires carcinomateuses de souris (CECs) constituent le premier modèle qui permet l'étude *in vitro* de la différenciation cardiaque. Ces cellules sont comparables à la population de cellules souches que l'on trouve dans les tératocarcinomes qui sont des tumeurs dérivant de cellules germinales primordiales. Plusieurs lignées cellulaires euploïdes et pluripotentes ont été dérivées de tératocarcinomes générés par injection sous-cutanée d'embryons de souris au stade gastrula (Kleinsmith and Pierce 1964; Martin and Evans 1974). Les lignées de CECs peuvent être propagées en culture de manière simple et pratique durant de très longues périodes et elles sont pluripotentes, car elles forment un tératome après injection sous-cutanée dans une souris « nude ». *In vitro*, la différenciation des CECs est induite en laissant ces cellules s'agréger en suspension et former des structures 3D appelées corps embryoïdes (CE) (Martin and Evans 1975).

La plupart des études sur les CECs furent effectuées sur la lignée P19 (McBurney and Rogers 1982). Avec cette lignée, la différenciation cardiaque peut être induite par l'agrégation cellulaire combinée avec l'ajout, dans le milieu de culture, de concentrations faibles de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) (Edwards 1983; McBurney 1982) ou d'acide rétinoïque (AR) (Edwards and McBurney 1983). En utilisant ce protocole, une partie des cellules se différencie en cardiomyocytes et commencent à se contracter spontanément. Une autre lignée qui se différencie avec une efficacité d'environ 90% vers le phénotype cardiaque fut sous-clonée à partir des P19 et nommée P19CL6 (Habara-Ohkubo 1996). Cependant, en l'absence de DMSO ou d'AR, il n'y a pas de cardiogenèse spontanée.

F.1.1 Caractérisation des cardiomyocytes dérivées à partir de CECs

Les cardiomyocytes dérivés de CECs expriment des protéines sarcomériques cardiaques comme les actines α -cardiaque et α -squelettique, les chaînes lourdes de myosine (Myosin Heavy Chain ou MHC), la chaîne légère de myosine (mlc) 2 atriale et la mlc1 (Rudnicki 1990). Des potentiels d'action (PA) et des courants ioniques typiques de cellules cardiaques peuvent être mesurés dans ces cellules et leurs propriétés changent au fur et à mesure que les cellules deviennent plus âgées, un phénomène également appelé maturation (van der Heyden 2003; Wobus 1994). Ces études indiquent que le modèle des CECs récapitule de manière comparable *in vitro* la cardiogenèse murine. Cependant, les cardiomyocytes obtenus restent à un stade de développement embryonnaire ou néonatal.

Le modèle des CECs a été utilisé afin d'identifier de nouveaux régulateurs de la cardiogenèse, ainsi que leurs gènes cibles. Par exemple, un facteur de transcription précoce, nommé Myocytic Induction/Differentiation ORiginator (MIDORI) fut identifié en utilisant la technique de « differential display » des ARNm (Hosoda 2001). Cette protéine est exprimée *in vivo* au jour 7.5 dans le mésoderme cardiaque de l'embryon de souris et la surexpression de MIDORI dans des cellules P19 augmente le nombre de cellules exprimant de la myosine. Des études plus fines de l'expression génique au moyen de « cDNA microarrays » sur les cellules P19CL6 ont confirmé une expression augmentée de plusieurs gènes connus pour leur rôle dans la différenciation cardiaque *in vivo*, comme eHAND, MEF2C et *mlc*, mais aussi montré des changements d'expression d'un grand nombre d'« Expressed Sequence Tags » ou ESTs dont la fonction reste à déterminer et qui pourraient donc être des régulateurs précoces de la cardiogenèse (Peng 2002). Liu *et al.* (Liu 2005) investiguèrent l'effet d'une expression diminuée ou augmentée de Nkx2.5 sur l'expression génique par cDNA microarrays. Cette étude démontra un effet transcriptionnel positif de Nkx2.5 sur l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation du TGF β et sur Brachyury, un facteur de transcription de type T-box exprimé dans le mésoderme.

F.1.2 CECs: facteurs et voies de signalisation impliqués dans la différenciation cardiaque

Durant la différenciation cardiaque, des facteurs de croissance et des morphogènes sécrétés surtout par des cellules dérivées des autres feuillets embryonnaires jouent un rôle très important (Figure 1). La nécessité de la présence d'une couche d'endoderme extra-embryonnaire primitif autour des futures cellules cardiaques fut tout d'abord démontrée dans des CE formés avec des CECs (Smith 1987). Plus tard, Mummery *et al.* (Mummery 1991) montrèrent via la coculture de cellules P19 avec une lignée cellulaire d'endoderme viscéral, nommée END-2, que des cellules dérivées de l'endoderme viscéral, et non de l'endoderme pariétal ou du mésoderme, peuvent induire la différenciation cardiaque indépendamment du DMSO. En fait, du surnageant de culture de cellules END-2 est suffisant pour activer le processus, démontrant le rôle des facteurs solubles sécrétés par l'endoderme.

Les facteurs BMPs font partie de la superfamille du TGF- β et sont sécrétés par l'endoderme. Leur effet fut investigué en créant une lignée de P19CL6 surexprimant *noggin*, un antagoniste des BMPs (Monzen 1999). Cette lignée était incapable de se différencier en cardiomyocytes, mais le phénotype pouvait être contrecarré par la surexpression, dans ces mêmes cellules, de BMP-2, de TAK1 (une MAPK Kinase Kinase)

ou de Nkx2.5 et GATA-4 ensemble, ainsi que par l'addition de BMPs exogènes au milieu de culture. Ces résultats démontrent le rôle des BMPs dans l'induction cardiaque et définissent la voie de signalisation p38/Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) comme étant une des voies impliquées dans la cardiogenèse. Ce dernier fait a été confirmé par d'autres études (Davidson and Morange 2000; Eriksson and Leppa 2002). Les protéines Smad, médiateurs connus de la voie du TGF- β , ont aussi été proposées comme étant les effecteurs en aval des BMPs. En effet, la co-expression de Smad1 et Smad4 a également pu restaurer la différenciation cardiaque via l'activation le facteur de transcription ATF-2 dans la lignée de P19 surexprimant noggin (Monzen 2001). Une autre voie de signalisation activée par les BMPs a été impliquée dans la cardiogenèse à partir de CECs. L'expression de MEF-2A et de la MHC est également activée par le BMP-2 dans les P19CL6 via un mécanisme dépendant de la Phosphatidyl-Inositol-3-kinase (PI-3-kinase) (Ghosh-Choudhury 2003). Naito *et al.* (Naito 2003) ont montré que l'inhibition de la PI-3-kinase par de la Wortmannin ou du LY294002 pouvait abolir la différenciation cardiaque. En résumé, le TGF- β et les BMPs favorisent la cardiogenèse à travers l'activation d'au moins trois voies de signalisation, deux voies impliquant p38/MAPK ou les protéines Smads et qui ont ATF-2 comme cible en aval, et une voie impliquant la PI-3-kinase.

Plusieurs études effectuées avec des CECs ont montré que l'activation de la voie non-canonique par Wnt11 jouait un rôle dans la cardiogenèse (Pandur 2002). En effet, du milieu de culture conditionné avec Wnt11 peut déclencher la différenciation cardiaque en absence de DMSO. Cependant, Nakamura *et al.* (Nakamura 2003) ont rapporté que dans le modèle des CECs également, Wnt3a et Wnt8a, deux protéines qui activent la voie canonique Wnt/ β -caténine et qui sont donc décrites habituellement comme ayant un effet inhibiteur, étaient néanmoins exprimées et que la β -caténine pouvait être trouvée dans sa forme activée. Ils ont également montré que du milieu conditionné avec Wnt3a pouvait tripler le nombre de P19 différenciées exprimant de la MHC. Ce dernier résultat est contradictoire comparé aux résultats obtenus *in vivo*, mais cette différence pourrait être expliquée par le fait que des P19CL6 en train de se différencier contiennent une population mixte de cellules. Certaines des protéines étudiées pourraient donc éventuellement être exprimées dans des cellules cardiaques ou non-cardiaques et peuvent donc avoir un effet direct ou indirect sur le processus de cardiogenèse.

Sonic hedgehog (SHH), une protéine impliquée dans le modelage de l'embryon au tout début du développement, est également capable d'augmenter l'efficacité du processus cardiogénique quand elle est surexprimée dans des cellules P19 (Gianakopoulos and Skerjanc 2005). EN effet, SHH déclenche l'expression de Gli2, qui active alors l'expression du facteur pro-cardiogénique BMP-4 et des facteurs de transcription cardiaques MEF2C, GATA4 et Nkx2.5.

Hidai *et al.* (Hidai 2003) ont étudié l'effet du FGF-1 et du FGF-2 et montré que l'exposition de cellules en cours de différenciation au FGF-1 induisait l'expression de marqueurs cardiaques (BMP-4, GATA-4 et Tbx5) et du marqueur endothélial PECAM, alors que le FGF-2 abolissait l'expression de GATA-4, mais augmentait l'expression de MyoD et de noggin. Ces résultats suggèrent que le FGF-1 a un effet positif sur la cardiogenèse, car il promeut en premier lieu la spécification du mésoderme latéral. La Figure 3A présente les différents facteurs de croissance dont l'implication dans la différenciation cardiaque a été découverte ou confirmée en utilisant le modèle des CECs, ainsi que les voies de signalisation qu'ils activent.

D'autres types de facteurs peuvent augmenter la cardiogenèse des CECs. La Dynorphine B, un agoniste du récepteur κ -opioïde, est capable d'induire l'expression de Nkx2.5, de GATA-4 et de la MHC (Ventura and Maioli 2000), alors que le traitement de P19 pré-incubées au DMSO avec un antagoniste du récepteur κ -opioïde inhibe la cardiogenèse. L'oxytocine, une hormone hypothalamique impliquée dans la contraction des cellules musculaires lisses lors des contractions utérines et de la lactation, induit également la différenciation cardiaque en l'absence de DMSO et permet même une différenciation plus rapide, car les cardiomyocytes obtenus commencent à se contracter après 8 jours de différenciation au lieu de 12 (Paquin 2002). De manière similaire, l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) est aussi capable de suppléer à l'effet du DMSO (Rodriguez 1994).

Plusieurs composants chimiques autres que le DMSO furent également testés pour leur aptitude à promouvoir la cardiogenèse des CECs. L'analogue nucléosidique 5-azacytidine peut s'insérer dans l'ADN lors de la réplication et mener à une hypométhylation et donc à la re-expression de certains gènes. L'effet de cette molécule fut en premier lieu décrit sur des cellules NIH/3T3, dans lesquelles elle a pu induire la différenciation en phénotypes ressemblant à des chondrocytes, des adipocytes et à des myotubes squelettiques (Taylor and Jones 1979). Le traitement de CE avec la 5-azacytidine n'augmente pas la cardiogenèse dans des CE, mais déclenche l'expression de l' α -actinine et de la troponin T cardiaque dans environ 6% de cellules attachées en couche, c'est-à-dire sans formation de CE (Choi 2004).

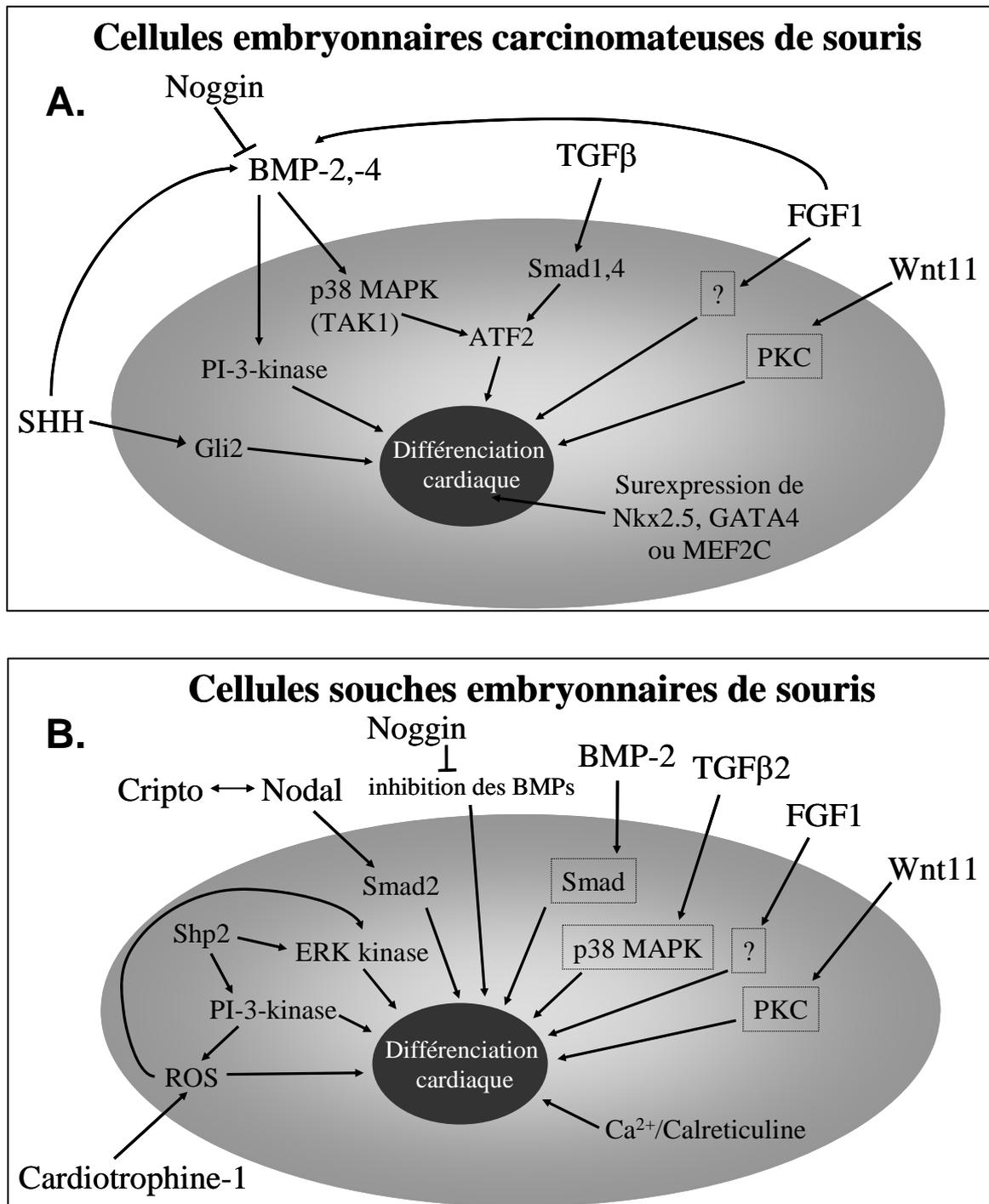


Figure 3. Schéma des différents facteurs de croissance qui jouent un rôle dans la différenciation cardiaque des CECs (A) et des CSEs (B), ainsi que les voies de signalisation qu'ils activent. Tous ces résultats ont été spécifiquement obtenus sur les modèles de CECs et de CSEs, excepté les parties de voies de signalisation encadrées, qui correspondent aux molécules activées de manière consensuelle dans les voies en questions.

Finalement, la surexpression de facteurs de transcription cardiaques a été utilisée pour essayer d'augmenter l'efficacité du processus de cardiogenèse à partir de CECs. Des cellules surexprimant Nkx2.5, MEF2C (Skerjanc 1998) ou GATA-4 (Grepin 1997) peuvent se différencier en cardiomyocytes en absence de DMSO, ce qui indique que

chacun de ces facteurs peut déclencher à lui seul le programme de différenciation cardiaque. De plus, Monzen *et al.* (Monzen 2002) ont confirmé que des cellules surexprimant la protéine Nkx2.5 native se différenciaient en cellules cardiaques indépendamment du DMSO, alors que des cellules surexprimant deux isoformes mutantes de Nkx2.5 isolées de patients avec malformations cardiaques ne le pouvaient pas. Le facteur de transcription TBX5 peut, quant à lui, induire des contractions spontanées plus précoces, sans augmenter le nombre total de cardiomyocytes (Fijnvandraat 2003; Hiroi 2001). Les facteurs et composants chimiques ayant l'aptitude d'augmenter l'efficacité du processus de différenciation cardiaque dans le modèle des CECs sont listés dans la Figure 4.

F.2 Cellules souches embryonnaires de souris

Les premières lignées de cellules souches embryonnaires de souris (CSEs) furent dérivées en 1981 à partir d'embryons de souris au stade blastocyste (Evans and Kaufman 1981). La propagation en culture de ces cellules nécessite des conditions plus strictes afin de prévenir la différenciation spontanée et est donc plus difficile que celle des CECs. En particulier, les CSEs doivent être cultivées le plus souvent en présence de cellules nourricières comme des fibroblastes embryonnaires de souris (mouse embryonic fibroblasts ou MEFs) inactivés. En 1985, Doetschman *et al.* (Doetschman 1985) ont décrit pour la première fois la présence de cellules cardiaques dans des CE dérivés de CSEs.

F.2.1 Caractérisation des cardiomyocytes dérivées à partir de CSEs

L'expression au cours du temps de différentes protéines sarcomériques dans des cardiomyocytes dérivés de CSEs a été investiguée de manière extensive. Guan *et al.* (Guan 1999) ont montré que plusieurs protéines s'inséraient dans les sarcomères successivement et de la même manière qu'au cours du développement du cœur de poulet fœtal *in vivo*. D'autres études indiquent que la β -MHC, qui est exprimée *in vivo* pendant la vie fœtale, est exprimée après 3-4 jours de différenciation, alors que la α -MHC, habituellement exprimée *in vivo* seulement à l'âge adulte, peut être détectée après 8 jours de différenciation *in vitro* (Robbins 1990; Sanchez 1991). L'analyse des isoformes de tropomyosine a montré que l' α -tropomyosine spécifique du muscle strié est exprimée dans des CE après 6 jours de différenciation et que la β -tropomyosine spécifique du muscle strié est déjà présente dans des CSEs indifférenciées, tout comme plusieurs autres isoformes de tropomyosines non-musculaires (Muthuchamy 1993). Miller-Hance *et al.* (Miller-Hance 1993) ont étudié l'expression au cours du temps des chaînes légères de

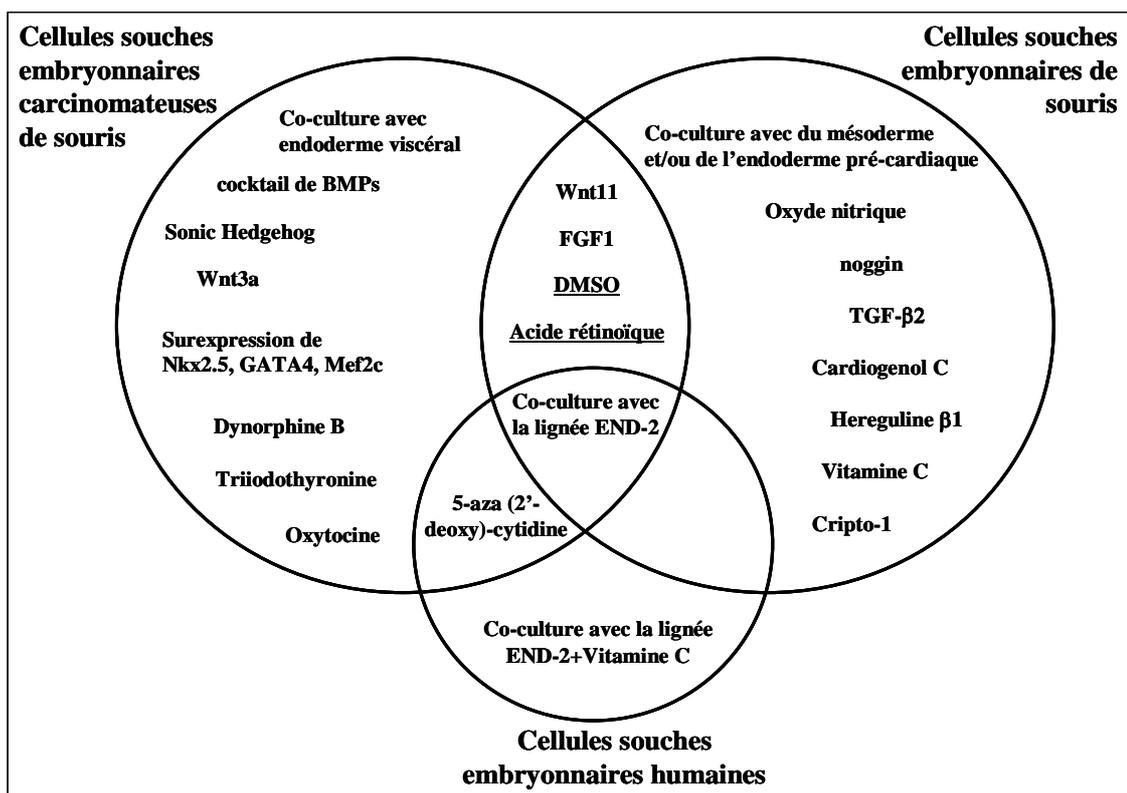


Figure 4. Facteurs ayant l'aptitude d'augmenter la différenciation cardiaque dans les modèles de CSE. Certains facteurs ou composés favorisent la cardiogenèse à partir de CECs, de CSEs et/ou de CSEh. Les facteurs soulignés ont été rapportés comme n'étant pas efficace pour augmenter la cardiogenèse à partir de CSEh.

myosine et montré que l'isoforme ventriculaire *mlc2v* est exprimé dans des CE, suggérant que ces cellules cardiaques peuvent se différencier *in vitro* en un phénotype ventriculaire. Concernant les différentes isoformes d'actine, les actines α -musculaire lisse, α -squelettique et α -cardiaque sont toutes exprimées dans les cardiomyocytes dérivés de CSEs et incorporées dans des sarcomères (Ng 1997). Afin d'étudier l'effet de la matrice extracellulaire sur la maturation ultrastructurale de cardiomyocytes isolés de CE, des cellules cardiaques furent placées dans des plaques de cultures soit en plastique, soit couvertes de matrigel ou soit couvertes de cardiogel, une matrice déposée par des fibroblastes isolés de cœur de souris néonataux (Baharvand 2005). Sur cardiogel, les cellules avaient une meilleure organisation sarcomérique, ce qui signifie qu'une matrice qui mime les conditions *in vivo* permet une meilleure maturation des cellules *in vitro*.

Fonctionnellement, des études électrophysiologiques ont tout d'abord révélé que les formes des PA mesurés sur des cardiomyocytes dérivés de CSEs étaient principalement de type embryonnaire ou pacemaker et que ces cellules répondaient à des agents chronotropes et des bloqueurs de canaux ioniques (Wobus 1991). Plus tard, l'analyse par patch-clamp de cardiomyocytes isolés a montré que les caractéristiques des PA deviennent plus matures au fil du temps. En effet, dans des cardiomyocytes précoces,

seuls des PA de types pacemaker peuvent être mesurés, alors qu'à des temps de différenciation plus tardifs, des PA de type pacemaker, atriaux et ventriculaires sont présents (Maltsev 1993). Plusieurs autres études ont investigué des aspects fonctionnels spécifiques et montré que, dans ces cellules cardiaques dérivées de CSEs, des courants ioniques apparaissent d'une manière régulée développementalement (Doevendans 2000; Maltsev 1994), que le système β -adrénergique est fonctionnel (Ali 2004) et que les propriétés contractiles sont sensibles au calcium (Metzger 1994). De plus, le courant calcique de type T a été caractérisé en détails (Manabe 2004; Zhang 2003b), tout comme le couplage de l'échangeur Na^+/Ca^+ avec la Na^+/K^+ ATPase (Otsu 2005). L'apparition de sous-types de cardiomyocytes a pu être suivie au moyen de gènes rapporteurs mis sous le contrôle de différents promoteurs cardiaques. On a ainsi pu enrichir le nombre de cellules pacemaker et atriales lorsque le promoteur de la α -MHC est utilisé (Kolossoff 2005) ou de cellules pacemaker uniquement lorsqu'on utilise le promoteur du peptide atrial natriurétique (ANP) (Gassanov 2004). Dans cette dernière étude, le traitement des CE avec de l'endothéline-1 a également permis d'augmenter le pourcentage total de cellules pacemaker. Quant aux cardiomyocytes ventriculaires, ils peuvent être isolés lorsqu'on utilise un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de la *mlc2v* (Meyer 2000).

En résumé, la caractérisation *in vitro* des cardiomyocytes dérivés de CSEs montre une corrélation claire avec le développement *in vivo*, ce qui permet de valider le modèle de différenciation des CSEs comme étant approprié pour l'étude du développement cardiaque *in vitro*.

L'aptitude des cardiomyocytes dérivés de CSEs à réparer un myocarde endommagé a été évaluée *in vivo* par des expériences de transplantation. Klug *et al.* (Klug 1996) ont injecté des cardiomyocytes sélectionnés dans du myocarde non-infarcté de souris adultes *mdx* (une souche de souris qui n'a pas de dystrophine). Ils ont observé que des cardiomyocytes exprimant la dystrophine pouvaient être retrouvés dans le muscle cardiaque après injection et qu'ils contenaient même des sarcomères orientés de la même manière que les cellules cardiaques de l'hôte, sans formation de tératome. Dans un modèle d'infarctus chez la souris, la transplantation de cardiomyocytes exprimant spécifiquement une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein ou GFP) et micro-disséqués améliora de manière significative la fonction cardiaque des animaux transplantés comparé aux animaux contrôles (Yang 2002). Cependant, la pureté des cellules injectées et le risque de formation de tératome sont deux questions d'une importance cruciale, car il a été montré que seulement deux CSEs indifférenciées peuvent provoquer un tératome après injection sous-cutanée chez la souris "nude" (Lawrenz 2004).

F.2.2 CSEs: facteurs et voies de signalisation impliqués dans la différenciation cardiaque

De nombreux facteurs et morphogènes jouant un rôle dans la différenciation cardiaque ont déjà été identifiés grâce aux modèles *in vivo* (Figure 1). Ils ont également été testés sur des CSEs en train de se différencier à l'intérieur de CE, soit dans le but de confirmer leur implication dans la cardiogenèse, soit afin d'augmenter le pourcentage de cellules se différenciant en cardiomyocytes. Les facteurs nécessaires ou ayant l'aptitude d'augmenter le processus cardiogénique des CSEs sont résumés dans les Figure respectivement 3B et 4. La présence de cellules dérivées de l'endoderme est nécessaire dans les CE pour que la cardiogenèse ait lieu. En fait, Bader *et al.* (Bader 2001) ont montré qu'une couche de cellules d'endoderme primitif se trouve autour des CE après deux jours de différenciation et que l'ablation enzymatique de cette couche inhibe la cardiogenèse. Dans une autre étude, la coculture de CE précoces avec des explants endodermique pré-cardiaques de poulet a induit la présence de groupes de cellules contractiles dans 65% des CE, comparé à 10% dans des CE cultivés dans des conditions contrôles (c'est-à-dire des CE seuls, ou des CE en coculture avec des MEFs ou avec des explants endodermique non-précardiaques (Rudy-Reil and Lough 2004). Il est à noter que des explants d'endoderme et de mésoderme pré-cardiaque ensemble ont un effet plus puissant, car ils induisent la présence de cellules cardiaques dans 100% des CE, ce qui laisse penser que le mésoderme et les facteurs qu'il secrète jouent aussi un rôle très important. La coculture de CSEs avec la lignée endodermique END-2 favorise aussi la cardiogenèse, confirmant les résultats obtenus sur les CECs (Mummery 2002).

L'étude de facteurs spécifiques sécrétés par l'endoderme a montré que le traitement de CSEs avec du BMP-2 et du TGF- β avant la formation de CE induit l'expression des ARNm de Brachyury, Nkx2.5 et MEF2C (Behfar 2002). De plus, les CE formés à partir de ces cellules prétraitées contenaient des zones contractiles plus grandes et le traitement de ces cellules prétraitées avec l'inhibiteur de BMP noggin inhibaient l'effet positif des deux facteurs. L'effet de noggin sur la différenciation cardiaque est cependant controversé. D'un côté, la surexpression continue inhibe la cardiogenèse dans les CE dérivés de CECs (Monzen 1999) et de CSEs (Behfar 2002). Dans la même étude, un milieu de culture conditionné sur des cellules exprimant noggin pouvait même inhiber la différenciation cardiaque de CSEs en coculture avec des cardiomyocytes néonataux. D'un autre côté, Yuasa *et al.* (Yuasa 2005) ont exploité l'observation intéressante que noggin est exprimé brièvement *in vivo* chez la souris dans l'aire cardiogénique. En prétraitant des CSEs avec noggin avant la formation de CE, l'effet de noggin devient pro-cardiogénique et le pourcentage de CE contenant des cardiomyocytes passe de 10% à plus de 95%. En

conclusion, l'inhibition de la signalisation dépendant des BMP par noggin pourrait avoir un effet inverse sur la cardiogenèse, dépendamment de quand et de combien de temps le traitement est appliqué.

En ce qui concerne les autres facteurs, il a été démontré que le TGF- β 2, et non le TGF- β 1 ou le TGF- β 3, pouvait augmenter le pourcentage de CE contenant des cardiomyocytes (Kumar and Sun 2005). Une étude avec des CSEs dérivés de souris knock-out pour le récepteur de FGF1 a également indiqué que l'absence de ce récepteur réduit le pourcentage de CE qui se contractent de 90% à 10%, ce qui démontre l'implication de la signalisation dépendante de FGF1 dans la différenciation cardiaque (Dell'Era 2003). Cripto est un autre facteur de croissance exprimé dans le cœur en développement, qui agit comme le cofacteur d'un des membres de la superfamille TGF- β appelé Nodal. Xu *et al.* (Xu 1998) ont démontré le rôle de Cripto dans la cardiogenèse, car sa délétion dans des CSEs prévient l'apparition de cellules cardiaques contractiles. L'effet de Cripto sur la cardiogenèse est dépendant de l'attachement de Cripto au récepteur Alk4 et de l'activation de la voie impliquant Smad2 (Parisi 2003).

L'implication de la voie Wnt non-canonique dans la cardiogenèse a été confirmée. En utilisant des CSEs exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de Nkx2.5, Terami *et al.* (Terami 2004) ont en effet rapporté que du milieu conditionné avec Wnt11 augmentait le pourcentage de CE contenant des cardiomyocytes de 7 à 15% et, donc, que Wnt11 a un effet positif sur la cardiogenèse.

D'autres études ont démontré l'implication de deux autres voies de signalisation dans la différenciation cardiaque des CSEs: la voie impliquant l'heregulin et le récepteur ErbB (Suk Kim 2003) et la voie de l'Ephrine (Wang 2004).

Puisque les expériences de différenciation ont été effectuées dans la plupart des études précitées en présence de 20% de sérum bovin fœtal (Fetal Bovine Serum ou FBS), les facteurs déjà présents dans le FBS ont pu interférer avec l'effet des facteurs ajoutés au milieu afin de tester leur effet pro-cardiogénique. Sachinidis *et al.* (Sachinidis 2003) ont donc développé un protocole de différenciation sans sérum en passant à jour 5 de différenciation d'un milieu contenant 20% de FBS à un milieu contenant un succédané de sérum (composé d'albumine de sérum bovin (BSA), de transferrine et d'insuline, mais pas de facteurs de croissance). Dans ces conditions, 80% des CE contenaient des zones contractiles et ce chiffre augmentait à 100% si du PDGF-BB était ajouté. Cependant, les cellules obtenues ne contenaient pas un haut degré d'organisation sarcomérique, ce qui indique qu'elles gardent un phénotype immature.

Le modèle des CSEs a aussi permis de confirmer l'implication d'autres voies de signalisation dans la différenciation cardiaque. L'étude de CSEs déficientes pour Shp2 a montré que l'absence de cette tyrosine phosphatase, qui est habituellement exprimée

d'une manière ubiquitaire durant le développement de la souris et est impliquée dans la signalisation en aval de facteurs de croissance, diminuait la cardiogenèse dans les CE (Qu and Feng 1998). Shp2 est connu pour activer la voie de la kinase ERK et de la PI3-kinase. Le traitement de CE avec l'inhibiteur de la PI-3-kinase LY294002 ralentit la croissance cellulaire dans les CE et diminue de manière marquée les zones contractiles (Klinz 1999). Cet effet pourrait être dû à une implication directe de la voie de la PI-3-kinase dans la prolifération et/ou la survie de cellules précurseurs cardiaques, plutôt qu'à un effet direct sur la cardiogenèse.

Une des conséquences possible de l'activation de la PI-3-kinase est la génération de radicaux libres (Reactive Oxygen Species ou ROS). Une étude de Sauer *et al.* (Sauer 2000) a rapporté que des CE de 2-3 jours produisent des quantités mesurables de ROS et que l'inhibition de cette production endogène de ROS par des « scavengers » diminue le pourcentage de zones contractiles. Un effet similaire a été obtenu en utilisant des inhibiteurs de la PI-3-kinase. Ce phénotype pouvait cependant être reversé par l'addition de ROS exogènes sur les CE traités aux inhibiteurs de la PI-3-kinase. La même équipe a également montré que la cardiotrophine-1 est l'un des facteurs endogènes qui promeut la survie et la prolifération des cellules cardiaques dans les CE à travers la génération de ROS (Sauer 2004). En effet, le traitement de CE avec de la cardiotrophine-1 augmente la quantité de ROS et active une voie de signalisation qui implique JAK2, NF- κ B, STAT3 et ERK. Une autre étude a confirmé le rôle de JAK2 et STAT3 dans les processus de cardiogenèse à partir de CSEs (Foshay 2005).

D'autres mécanismes intracellulaires, comme la signalisation induite par le calcium, ont été impliqués dans la différenciation cardiaque. La calréticuline (CRT), protéine chaperonne résidant dans le réticulum endoplasmique, joue un rôle dans la cardiogenèse, car cette dernière est anormale dans des CE formes à partir de CSEs déficientes pour la CRT à cause d'une mauvaise myofibrillogenèse (Li 2002). Ce phénomène est réversible lorsqu'on induit de manière transitoire une élévation de la concentration intracellulaire de calcium avec de la ionomycine dans des CE déficients pour la CRT. De manière similaire, l'inhibition des kinases dépendantes du calcium et de la calmoduline (CAMKs) dans des CE de type sauvage peut mimer le phénotype de CE déficients en CRT. Ceci indique qu'un point de contrôle calcique est essentiel à l'activation des CAMKs qui, à leur tour, induisent la translocation nucléaire de MEF2c et l'expression, la phosphorylation et l'incorporation de la mlc2v dans des sarcomères fonctionnels (Puceat and Jaconi 2005).

De petits composés chimiques connus pour augmenter la différenciation cardiaque de CECs ont aussi été testés sur des CSEs. Le DMSO pousse également les cellules vers une différenciation musculaire, mais l'effet n'était pas spécifique à la cardiogenèse, comme il a été démontré par la présence de cellules de muscle squelettique et lisse avec

les cardiomyocytes (Dinsmore 1996). A l'opposé des CECs, l'effet de l'AR sur la différenciation des CSEs en cellules cardiaques est controversé et apparemment extrêmement dépendant de la dose et du laps de temps où l'AR est appliqué sur les cellules. Des concentrations plus élevées que 10^{-9} M semblent diminuer l'expression des gènes cardiaques et mésodermiques et favoriser la différenciation neuronale (Bain 1996; Dinsmore 1996). Cependant, d'autres études ont relaté que 10^{-9} M d'AR ne modifiait pas la quantité de zones contractiles (Dani 1997), ou qu'au contraire cette même concentration pouvait augmenter la proportion de cardiomyocytes (Wobus 1997). Dans la dernière étude citée, un changement de la répartition des sous-types de cardiomyocytes a pu même être observé en présence de 10^{-9} M d'AR. Le nombre de cellules cardiaques de phénotype type fibre de Purkinje et ventriculaire était en effet augmenté comparé aux cellules atriales et pacemaker. L'application de 10^{-6} M d'RA sur des CE active la voie de ERK, qui est impliquées dans la différenciation cardiaque, mais ces CE ne se contractent pas spontanément (Bost 2002). Le traitement de CE avec du PD98059, un inhibiteur de MEK1 (la kinase qui active ERK), n'a pas d'effet sur le pourcentage de CE qui se contractent. En conclusion, l'effet de l'AR sur la différenciation cardiaque semble être dépendant d'une voie de signalisation indépendante de ERK.

D'autres approches originales ont été testées. Par exemple, il a été documenté que le CD44, récepteur du hyaluronan, est exprimé dans le cœur embryonnaire (Wheatley 1993) et qu'après son attachement au récepteur, le hyaluronan est internalisé dans la cellule et peut donc agir comme porteur pour d'autres types de molécules. Le traitement de CE avec du hyaluronan conjugué à de l'AR et de l'acide butyrique induit une augmentation significative du nombre de zones contractiles, alors que du hyaluronan conjugué à un seul des composants donne des résultats similaires aux contrôles et que du hyaluronan seul diminue le nombre de zones contractiles (Ventura 2004).

Afin de découvrir des molécules à effet pro-cardiogénique, Takahashi *et al.* (Takahashi 2003) ont investigué l'effet de 880 composés chimiques approuvés pour l'usage chez l'homme sur des CSEs cultivées en couche plutôt que dans des CE. En utilisant une lignée transfectée avec la GFP sous le contrôle du promoteur de la α MHC, ils ont trouvé que l'acide ascorbique (ou vitamine C) induisait l'apparition de cinq fois plus de cellules contractiles positives pour la GFP que les conditions contrôles, alors que d'autres molécules anti-oxydantes comme la N-acétylcystéine ou la vitamine E n'avaient pas d'effet. Dans une autre étude, une librairie d'hétérocycles fut également testée pour l'aptitude de chaque molécule à induire la cardiogenèse de CSEs en couche (Wu 2004). Un composé en particulier, nommé cardiogenol C, mena à la différenciation des cellules en 40% à 55% de cardiomyocytes contractiles après 7 jours de culture.

L'oxyde nitrique (NO) est une petite molécule produite par plusieurs isoformes de l'enzyme Nitric Oxide Synthase (NOS) qui peut réguler des processus cellulaires via l'activation de la guanylate cyclase et la production de cGMP. Son implication dans la cardiogenèse a été rapportée, car plusieurs des isoformes de NOS sont exprimés dans le cœur embryonnaire et dans des CE (Bloch 1999). De plus, des inhibiteurs de NOS peuvent diminuer le degré d'organisation sarcomérique des cardiomyocytes dérivés de CSEs sans en diminuer le nombre. Une autre étude a également démontré que l'addition de NO exogène ou la surexpression des NOS augment le pourcentage et la surface totale des zones contractiles, ainsi que l'expression totale de protéines spécifiquement cardiaques (Kanno 2004).

F.3 Cellules souches embryonnaires humaines

En 1998, Thomson *et al.* (Thomson 1998) dérivèrent les premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) à partir d'embryons humains au stade blastocyste surnuméraires après fécondation *in vitro*. Parce qu'auparavant, la seule source de cardiomyocytes fœtaux humains venait de fœtus récupérés après avortement, les CSEh sont donc un nouvel outil unique dans l'étude des mécanismes de cardiogenèse humaine *in vitro*. La dérivation des CSEh a créé un énorme espoir et une mode, car les chercheurs espèrent arriver à traiter un jour certaines maladies par thérapie cellulaire, dont le cœur. Depuis 1998, plusieurs centaines de lignées de CSEh ont été dérivées à travers le monde (Hoffman and Carpenter 2005). Les protocoles de culture classique pour le CSEh impliquent une coculture des CSEh indifférenciées avec des cellules nourricières MEFs. La présence de MEFs pourrait aussi jouer un rôle dans la maintenance d'un caryotype normal des CSEh en diminuant la pression de sélection dans la culture (Draper 2004).

Afin d'induire la différenciation, la même technique que pour les CECs et les CSEs a été utilisée, c'est-à-dire la formation de CE. Parce que les CSEh poussent sous forme de grosses colonies et ne tolèrent pas bien d'être sous forme de cellules isolées, les CE sont formés en plaçant en suspension des colonies de CSEh en présence de FBS. Cette technique permet à la différenciation d'être déclenchée. La première démonstration du potentiel de CSEh de se différencier en cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires, y compris en cardiomyocytes, fut publiée en 2000 (Itskovitz-Eldor 2000).

F.3.1 Caractérisation des cardiomyocytes dérivées à partir de CSEh

Tout d'abord, la quantification du nombre de CE contenant des zones battantes montra que le phénomène n'était pas très fréquent, car seul 8% des CE en contenaient après 30 jours de différenciation (Kehat 2001). Ces cellules cardiaques exprimaient des gènes cardiaques comme Nkx2.5, GATA4, les troponines cardiaques T et I, ANP, α -MHC, mlc2v et mlc2a au niveau de l'ARNm. Des structures sarcomériques étaient visibles après immuno-marquage par exemple pour la Troponine I cardiaque et la MHC. Les cellules cardiaques obtenues montraient également la présence de transients calciques et leur fréquence de contraction était sensible à des agents chronotropes. Dans une autre étude, la présence de zones battantes fut observée dans 68% des CE après 15 jours de différenciation (Xu 2002). Ces différences importantes peuvent être expliquées par l'utilisation de lignées de CSEh différentes, de conditions de culture différentes ou de protocoles de différenciation différents.

La maturation ultrastructurale des cellules évaluée par microscopie électronique (ME) a montré que ces cardiomyocytes contenaient plus de sarcomères en fonction du temps et qu'ils étaient de mieux en mieux organisés (Snir 2003). La taille des cellules augmente également en fonction du temps et elles sont capable de se diviser jusqu'au jour 35 de différenciation. Cependant, l'absence de tubules T même après 60 jours semble indiquer que les cardiomyocytes dérivés de CSEh n'atteignent pas un phénotype adulte *in vitro*.

Plusieurs études fonctionnelles implémentent déjà nos connaissances des cardiomyocytes dérivés de CSEh. He *et al.* (He 2003) ont enregistré la présence de PA de type pacemaker, atriaux et ventriculaires dans ces cellules. De plus, un type de PA est en général prédominant dans un groupe de cellules cardiaque donné, ce qui suggère qu'un sous-type prédominant se développe dans chaque groupe.

La fonctionnalité des voies de signalisation muscariniques et β -adrénergique est également démontrée (Reppel 2004), tout comme la présence des courant Na^+ et pacemaker, mais l'absence du courant rentrant rectifiant de K^+ , ce qui suggère que le courant Na^+ a une importance majeure dans le déclenchement du PA (Satin 2004).

Le suivi des propriétés de conduction dans des groupes de cardiomyocytes connectés entre eux et isolés du reste du CE, puis mis dans des plaques de culture spéciales permettant des mesures fonctionnelles (Multi Electrode Arrays) a révélé que des zones ayant des vitesses de conduction différentes étaient présentes (Kehat 2002). Deux groupes pouvaient être distingués: un groupe à conduction rapide et un groupe à conduction lente. La vitesse de conduction semblait dépendre de la microarchitecture 3D de chaque zone battante, car la présence de faisceaux étroits de cardiomyocytes ralentit

l'influx électrique considérablement. Les vitesses de conduction mesurées dans ces expériences sont bien plus lentes que les valeurs du cœur humain adulte ou obtenues avec des couches de cardiomyocytes néonataux de rat ou de souris en culture.

L'aptitude des cardiomyocytes dérivés de CSEh à se connecter électriquement avec d'autres cellules cardiaques a été étudiée dans un modèle de coculture avec des cardiomyocytes ventriculaires néonataux de rat (Kehat 2004). Ces derniers initièrent des impulsions électriques qui étaient capables de se propager aux cardiomyocytes humains, démontrant la présence de connexions. Dans la même étude, l'intégration *in vivo* des cellules fut démontrée dans un modèle de bloc atrio-ventriculaire chez le cochon. En effet, l'implantation d'un groupe de cardiomyocytes dérivés de CSEh peut instaurer un rythme d'échappement dans ce modèle, comme démontré par des mesures ECG et du mapping électro-anatomique.

De manière similaire, Xue *et al.* (Xue 2005) ont montré dans un modèle de coculture avec cardiomyocytes quiescents néonataux de rat que, par contact direct, des cardiomyocytes dérivés de CSEh et disséqués pouvaient restaurer la propagation d'un influx électrique et fonctionner comme pacemaker des cellules de rat. De plus, après transplantation *in vivo*, cette fois dans un modèle de cryoablation du nœud atrio-ventriculaire chez le cochon d'inde, les cellules cardiaques humaines étaient également capable de se connecter et de fonctionner comme pacemaker. Ceci confirme les résultats de l'étude précédente et ces résultats indiquent que les cardiomyocytes dérivés de CSEh pourraient être utilisés comme pacemakers biologiques, au moins à court terme, car leur effet à long terme n'a pas encore été étudié.

F.3.2 CSEh: facteurs et voies de signalisation impliqués dans la différenciation cardiaque

Le rôle pro-cardiogénique de certains facteurs de croissance et morphogènes découvert sur les modèles de souris doit maintenant être démontré aussi pour la cardiogenèse humaine (Figures 1 et 3). Des stratégies qui permettraient d'augmenter l'efficacité du processus cardiogénique dans des CE formes à partir de CSEh sont actuellement investiguées très activement. L'effet de plusieurs facteurs de croissance sur des cellules de CE dissociés après 5 jours de différenciation a été investigué (Schuldiner 2000). L'Activine A et le TGF β 1 induisent l'expression de gènes mésodermiques, alors que l'AR, BMP-4, bFGF et EGF induisent l'expression de gènes mésodermiques et ectodermique et, finalement, NGF et HGF n'induisent pas d'expression spécifique.

Comme observé dans les modèles de CECs et CSEs, le système de coculture avec la lignée endodermique END-2 est favorisant pour la différenciation cardiaque sans

formation de CE (Mummery 2003). Les cellules obtenues avec ce protocole montrent aussi des phénotypes fonctionnels de cellules atriales, ventriculaires et pacemaker, comme observé par la forme des PA mesurés. Étonnamment, ce groupe de recherche a également montré qu'en diminuant la concentration de FBS de 20% à 0% dans le même système de coculture, ils pouvaient obtenir 24 fois plus de zones contractiles (Passier 2005). C'est pourquoi, en conclusion, les facteurs endodermiques sécrétés par la lignée END-2 sont suffisant pour déclencher la différenciation cardiaque, alors que le FBS, utilisé traditionnellement dans les expériences de différenciation avec des CE, semble contenir également des facteurs inhibiteurs.

Des molécules connues pour favoriser la cardiogenèse des CECs et des CSEs ont également été testées sur des CE en train de se différencier. Cependant, ni le DMSO, ni l'AR n'a augmenté le pourcentage de CE contenant des zones contractiles (Kehat 2001). À l'opposé, le traitement de CE du jour 6 au jour 8 de différenciation avec de la 5-aza-2'-déoxycytidine augmente la quantité de α -MHC exprimée (Xu 2002). À noter, l'addition d'acide ascorbique dans les cocultures CSEh-END-2 en absence de FBS a même pu augmenter de 40% le nombre de zones battantes (Passier 2005). La Figure 4 résume les facteurs et composés chimiques qui peuvent augmenter le processus de différenciation cardiaques à partir de CSEh.

F.4 Leçons tirées des modèles de cellules souches embryonnaires

Les travaux scientifiques effectués sur les CECs, CSEs et CSEh ont chacun amené de précieuses nouvelles informations sur le développement cardiaque, ce qui pourrait mener un jour à l'utilisation des CSEh dans des thérapies de transplantation cellulaire. La Figure 3 liste les facteurs de croissance et les voies de signalisation qu'ils activent et qui jouent un rôle dans la cardiogenèse des CECs et des CSEs. Les CECs ont permis pour la première fois d'étudier la différenciation cardiaque *in vitro* et une meilleure caractérisation de l'expression génique, des interactions entre facteurs de transcription, des interactions entre cellules et des facteurs de croissance requis pour la cardiogenèse (Figure 3A). La différenciation des CSEs en cardiomyocytes (Boheler 2005; Boheler 2002; Foley and Mercola 2004) a permis la caractérisation fine des effets de ces facteurs de croissance, ainsi qu'une caractérisation fonctionnelle poussée et l'étude des processus de maturation fonctionnelle cardiaque durant le développement (Figure 3B). Certains facteurs semblent cependant avoir un effet opposé dépendamment du moment et de la concentration où ils sont appliqués (par exemple, BMP-2 et noggin ou l'AR). L'étude des CSEh en est encore

à un stade très précoce. Il doit en effet encore être confirmé si les facteurs de croissance et les voies de signalisation en aval requis sont similaires entre les modèles de souris et humain. Les prochaines étapes fondamentales dans la caractérisation des cardiomyocytes dérivés de CSEh en vue de potentiels traitement par transplantation cellulaire chez l'homme impliquent les deux questions suivantes: Comment augmenter de manière importante la quantité de cardiomyocytes obtenue ? Et comment se comportent ces cellules après transplantations dans des modèles animaux?

Il y a souvent une certaine variabilité observable entre les différentes études qui utilisent des CSE. Ceci peut être expliqué par plusieurs raisons non-exclusives. Tout d'abord, le pourcentage de CE contenant des zones battantes dans les conditions contrôle peut varier de manière très importante dépendamment de la lignée cellulaire, des protocoles, des milieux de culture et/ou de la composition du FBS. Ensuite, les cellules en train de se différencier dans des CE forment une population mixte, excepté si les cellules étudiées sont purifiées spécifiquement. C'est pourquoi, selon la technique utilisée, il n'y a pas de certitude qu'un gène étudié est spécifiquement exprimé ou actif dans la population de cellules cardiaques. L'effet peut donc être direct ou indirect.

Travailler avec des cellules mésodermiques précurseur purifiées pourrait éviter ces problèmes techniques et permettre le test de facteurs de croissance sur des populations purifiées. Par exemple, des cellules mésodermiques précoces furent isolées en utilisant des CSEs contenant le gène de la GFP introduit dans le locus du gène Brachyury, un facteur de transcription mésodermique précoce (Kouskoff 2005). Ces cellules positives pour GFP sont capables de se différencier en cellules hématopoïétiques et cardiaques. L'isolation et la propagation de cellules progéniteurs cardiaques à partir de CE a aussi été rapportée récemment en sélectionnant les cellules qui exprimaient le marqueur mésodermique Flk1 et après coculture avec une lignée stromale nommée OP9 (Iida 2005).

Les modèles des CSE de souris et humaines récapitulent les deux de manière très similaire le développement cardiaque *in vivo* au niveau structurel et électrophysiologiques. Dans les deux modèles, les mesures fonctionnelles ont montré que les cardiomyocytes dérivés de CSE étaient capable de devenir plus mature au fil du temps. Les plus grosses différences entre les deux modèles et qui ont été mises en évidence par plusieurs groupes de recherche, incluent le plus faible pourcentage de CE contenant de zones battantes, la plus lente vitesse de différenciation et la fréquence de contraction plus basse chez l'homme que chez la souris, ce qui est compatible avec la durée du développement plus longue de l'homme. Cependant, le degré d'organisation sarcomérique n'atteint pas encore un phénotype adulte dans aucun de ces modèles.

Les stratégies pour promouvoir la différenciation cardiaque en traitent des CE ou des CSE en couche avec des facteurs pro-cardiogéniques ont donné des résultats préliminaires intéressants qui donnent l'espoir d'arriver à déterminer dans le futur la composition d'un "cocktail cardiogénique" qui aurait la faculté d'induire la différenciation en une population composée à 100% de cardiomyocytes. La Figure 4 résume ce qui augmente la différenciation cardiaque des CECs, CSEs et/ou CSEh. Tous ces facteurs ou composés chimiques peuvent avoir un effet permissif sur la cardiogenèse à différents niveaux. Ils peuvent, par exemple, favoriser la formation de mésoderme ou d'endoderme, la prolifération de cellules cardiaques précurseurs et/ou leur survie. La plupart des facteurs pro-cardiogéniques ont un effet démontré sur un seul des trois types cellulaires. Seul le système de coculture avec la lignée END-2 semble favoriser la cardiogenèse dans les trois modèles, ce qui confirme qu'un mélange de facteurs est le plus probablement nécessaire.

G. Cellules souches adultes

Le corps adulte contient des populations de cellules souches dont le rôle est de participer au maintien et à la réparation des organes. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques produisent toutes les cellules du sang, les cellules souches épithéliales régénèrent les épithéliums et les cellules satellite participent à la réparation du muscle strié squelettique. De nombreuses études ont démontré que ces cellules souches adultes ont un potentiel de différenciation restreint à leur organe d'origine, c'est-à-dire qu'elles sont unipotentes ou multipotentes. Cependant, des études récentes ont bouleversé cette vue et remis en question ce dogme (Lakshmiathy and Verfaillie 2005; Quesenberry 2005), ce qui a donné l'espoir de pouvoir utiliser des cellules du patient lui-même pour la thérapie cellulaire. Ce nouveau concept, appelé transdifférenciation, implique la faculté qu'aurait une cellule souche adulte de se différencier en une cellule d'un phénotype inattendu, par exemple en cardiomyocyte (Wagers and Weissman 2004).

Plusieurs études ont analysé le potentiel de la transplantation de cellules souches adultes *in vivo* à améliorer la fonction d'un myocarde endommagé, testant l'hypothèse que l'environnement local pouvait induire une différenciation appropriée. Bien que des études chez l'animal aient donné des résultats prometteurs, le mécanisme permettant une amélioration de la fonction cardiaque dans ce cas n'est pas encore bien compris. En effet, l'effet bénéfique pourrait être le résultat de la fusion des cellules transplantées avec les cellules endogènes, d'un effet sur la tension élastique de la paroi myocardique ou d'une augmentation de la néoangiogenèse. Ces processus n'impliqueraient donc pas directement une transdifférenciation en cellules cardiaques des cellules transplantées.

Afin de répondre à ces questions, l'aptitude des cellules souches adultes à se différencier en cardiomyocytes a donc été investiguée également *in vitro*, et nous allons consacrer le reste de cette revue à ces travaux.

G.1 Cellules souches adultes isolées de la moelle osseuse

Plusieurs types de cellules souches adultes résident dans la moelle osseuse (Figure 2). Tout d'abord, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent donner toutes les lignées du sang. Des greffes de cellules isolées de moelle osseuse totale contenant des CSH ou de CSH spécifiquement purifiées sont effectuées pour le traitement des leucémies par exemple depuis plusieurs dizaines d'années en clinique. Ces greffes constituent les premières procédures de thérapie cellulaire jamais effectuées. Deuxièmement, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Friedenstein 1976), aussi appelée cellules stromales de la moelle osseuse ou fibroblastes formeurs de colonies, sont les précurseurs *in vivo* des ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Pereira 1995). Finalement, le groupe de recherche du Professeur Verfaillie (Reyes and Verfaillie 2001) a isolé une sous-population de CSM et les a appelées cellules souches adultes multipotentes (Multipotent Adult Progenitor Cells ou MAPC), qui semblent être capable de se différencier en types cellulaires dérivant des trois feuilletts embryonnaires. Le rôle des MAPC *in vivo* n'est cependant pas encore éclairci.

G.1.1 Cellules souches hématopoïétiques

Le potentiel de différenciation inné des CSH comprend toutes les lignées cellulaires qui composent le sang. Leur aptitude à se différencier en cardiomyocytes a été extensivement investiguée *in vivo*. Jusqu'à maintenant, les résultats sont très contradictoires et controversés. Plusieurs études ont suggéré que des cellules isolées de moelle osseuse et donc enrichies en CSH pouvaient régénérer le myocarde dans des modèles animaux d'infarctus (Agbulut 2003; Jackson 2001; Kajstura 2005; Orlic 2001a; Orlic 2001b). Cependant, des publications récentes ont montré que la même population de cellules adoptait uniquement un phénotype hématopoïétique après transplantation (Balsam 2004; Murry 2004). D'autres stratégies comme la mobilisation de cellules précurseurs hématopoïétiques par du Stem Cell Factor et du Granulocyte-Colony Stimulating Factor ou G-CSF pendant le déroulement d'un infarctus ont également donné des résultats contradictoires (Deten 2005; Orlic 2001c).

Jusqu'à présent, il n'y a donc pas de consensus en ce qui concerne le potentiel des CSH à se différencier en cardiomyocytes *in vivo*. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats contradictoires. Premièrement, la purification des cellules injectées varie entre les études. En effet, l'enrichissement en CSH peut être effectué par déplétion des cellules hématopoïétiques matures et sélection des CSH parmi les cellules restantes avec des marqueurs de surface spécifiques aux cellules souches comme Sca1 et/ou c-kit. D'autres groupes ont utilisé de la moelle osseuse non-purifiée, car le type de cellule qui aurait cet effet bénéfique sur le myocarde n'est de toute manière pas encore déterminé. Deuxièmement, le nombre total de cellules injectées varie entre les études et les cellules sont administrées par différentes voies (intramyocardique, intracoronaire ou intraveineuse). Troisièmement, selon les études, les cœurs sont analysés à des temps variables après injection et finalement, certains des modèles sont xénogéniques ou allogéniques, ce qui peut avoir un effet sur le rejet par le système immunitaire.

Une question importante est de déterminer si les cellules qui viennent du donneur sont retrouvées dans le myocarde, car elles fusionnent avec les cellules cardiaques endogènes ou parce qu'elles se transdifférencient vraiment en cardiomyocytes. Dans certaines études, les auteurs ont observé uniquement des phénomènes de fusion (Alvarez-Dolado 2003; Kajstura 2005; Lapidos 2004; Nygren 2004; Terada 2002). Dans d'autres, fusion et transdifférenciation ont été relevées (Zhang 2004) ou transdifférenciation seulement (Kajstura 2005).

Peu de certitudes existent concernant le potentiel des CSH de générer des cardiomyocytes *in vitro*. Une seule étude a d'ailleurs rapporté qu'après culture en présence de dexaméthasone, d'AR, de prostaglandine E2, d'Interleukine 2 et de BMP-4, des cellules progéniteurs hématopoïétiques isolées de la moelle osseuse de poulet pouvaient exprimer plusieurs facteurs de transcription cardiaques ainsi que des protéines sarcomériques (Eisenberg 2003). Malheureusement, ces cellules ne se contractent pas spontanément.

G.1.2 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) se trouvent dans la moelle osseuse et sont classiquement isolées au laboratoire grâce à leur faculté d'adhérer au plastique (Friedenstein 1976). Elles peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes *in vivo* (Pereira 1995) et *in vitro* (Pittenger 1999). Les CSM peuvent être également isolées d'autres organes comme le tissu adipeux (Zuk 2001), le cordon ombilical (Romanov 2003) et le liquide amniotique, le placenta ou l'amnios (In 't Anker 2004).

Tout comme les cardiomyocytes, les CSM dérivent du mésoderme et il est donc très intéressant d'investiguer si les CSM ont la faculté de se différencier en cellule de phénotype cardiaque. Des études *in vitro* ont montré que le traitement avec la 5-azacytidine induit des CSM humaines à se différencier en cardiomyocytes qui cependant ne se contractent pas spontanément (Xu 2004). Avec des CSM de souris, Makino *et al.* (Makino 1999) ont pu observer des cellules contractiles 3 à 4 semaines après le traitement à la 5-azacytidine, mais le phénomène se produisait à une fréquence variable. Ces cellules exprimaient des protéines sarcomériques cardiaques ainsi que des récepteurs adrénérgiques et muscariniques fonctionnels et les auteurs ont pu mesurer des PA de type pacemaker et ventriculaires (Hakuno 2002). Malheureusement, d'autres groupes n'ont pas réussi à reproduire ces résultats (Cao 2004; Liu 2003) ou alors seulement en cultivant les CSM avec des cardiomyocytes néonataux (Rastan 2005; Takeda 2004). Cependant, lorsqu'une étape de coculture est ajoutée au protocole, des événements de fusion cellulaire doivent être indubitablement écartés (Camargo 2004). En effet, une étude *in vitro* a montré que des cardiomyocytes néonataux isolés peuvent fusionner à basse fréquence avec des fibroblastes cardiaques ou des cellules endothéliales (Matsuura 2004).

Les autres stratégies déjà testées pour pousser des CSM à adopter un phénotype cardiaque incluent la surexpression de la myocardine, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cardiaque et du muscle lisse, qui est capable d'activer dans des CSM humaines l'expression de gènes cardiaques et du muscle lisse (van Tuyn 2005). HCN2, une des protéines qui forme le canal du courant pacemaker, a aussi été surexprimée dans des CSM et induit des courants de type pacemaker dans ces cellules (Potapova 2004). Après transplantation dans le ventricule gauche de chiens, ces cellules ont formé des jonctions gap avec les cardiomyocytes environnants et induit un rythme d'échappement quand le rythme sinusal était bloqué, agissant donc comme un pacemaker biologique. En résumé, peu de résultats existent qui démontrent le potentiel des CSM à se différencier en cellules cardiaques *in vitro*.

La transplantation de CSM dans le cœur de plusieurs modèles animaux semble améliorer la fonction cardiaque, mais il n'est de nouveau pas clair si c'est par formation de cardiomyocytes *de novo* (ou transdifférenciation) ou via un effet pro-angiogénique (Gojo 2003; Nagaya 2004; Toma 2002). Comme les cellules survivent en général mal à l'injection intra-myocardique directe, des CSM de rat ont été transduites avec Akt1, une sérine thréonine kinase connue pour avoir un effet anti-apoptotique prononcé. Après injection dans un modèle d'infarctus chez le rat, ces cellules ont pu régénérer 80% à 90% du volume cardiaque perdu faisant quatre fois mieux que des CSM contrôle (Mangi 2003). Ce même groupe de recherche a cependant montré récemment que le phénomène

observé dépendait d'un effet paracrine. En effet, l'injection de milieu conditionné sur ces CSM exprimant Akt1 donne les mêmes résultats que dans l'étude précédente (Gnecchi 2005). Malgré ces résultats mitigés et controversés, des essais cliniques ont débuté chez des patients avec infarctus récent. De la moelle osseuse autologue a été injectée dans l'artère coronaire gauche et un suivi à 6 mois a montré une amélioration de la fonction cardiaque comparé aux patients n'ayant pas reçu de greffe (Chen 2004; Wollert 2004).

Comme les CSM sont une population de cellules hétérogènes, la purification de CSM homogènes a été tentée en utilisant des marqueurs de surface. Stro-1 est l'un des marqueurs candidats (Simmons and Torok-Storb 1991), car des cellules humaines positives pour Stro-1 sont capables de se différencier en phénotypes de type adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes et cellules de muscle lisse vasculaire (Dennis 2002). Cependant, les anticorps anti-Stro-1 reconnaissent aussi les précurseurs érythroïdes. Trois autres anticorps, SH2, SH3 et SH4, furent produits contre les CSM humaines (Haynesworth 1992). SH2 reconnaissait l'endogline (Barry 1999), une glycoprotéine associée avec les récepteurs à TGF β alors que SH3 et SH4 reconnaissaient le CD73 (Barry 2001), une glycoprotéine ancrée au glycophosphatidylinositol (GPI) et exprimée habituellement sur les cellules lymphoïdes. Malheureusement, l'endogline et le CD73 ne sont pas exprimé exclusivement sur les CSM. Donc, jusqu'à maintenant, malgré la possibilité d'enrichir la fraction contenant des CSM avec différents anticorps de surface, il n'y a pas encore de marqueur disponible pour sélectionner positivement des CSM.

G.1.3 Cellules progénitrices multipotentes

Les cellules adultes progéniteurs multipotentes ou MAPC constituent une autre population de cellules intéressantes, car elles ont l'aptitude de se différencier en cellules des trois feuilletts embryonnaires (Reyes and Verfaillie 2001). Le protocole d'isolation comprend, à la différence des MSC, l'usage de plaques de cultures couvertes de fibronectine et d'un milieu contenant 2% de FBS, de l'EGF, du PDGF-BB et du LIF. Deux ou trois semaines après isolation, une étape de déplétion avec des anticorps contre le CD45 et la Glycophorine A permet d'enlever, respectivement, les cellules hématopoïétiques et les globules rouges. Alors que des cellules primaires comme les CSM prolifèrent habituellement *in vitro* durant de courtes périodes seulement, les MAPC peuvent être propagés en culture pendant plus de 120 doublements de population. Ces cellules expriment Oct4 (un marqueur habituellement exprimé dans les cellules pluripotentes comme les CSE) et, après injection dans un embryon de souris au stade blastocyste, un chimérisme de plus de 45% peut être retrouvé, y compris dans le cœur (Jiang 2002). Depuis lors, d'autres groupes ont rapporté l'isolation de cellules

multipotentes à partir de moelle osseuse (Yoon 2005) ou de sang de cordon ombilical (Kogler 2004). L'aptitude de ces cellules à se différencier en cellules cardiaques n'a pas encore été démontrée, mais, parce que leur potentiel de différenciation semble plus large *in vitro*, c'est une voie intéressante à explorer.

G.2 Cellules souches du muscle squelettique

Le muscle squelettique contient une population de cellules souches bien caractérisées appelées cellules satellites. Leur rôle *in vivo* est de régénérer les myotubes squelettiques blessés. Comme elles sont programmées pour se différencier en muscle squelettique, leur potentiel à dévier vers le muscle cardiaque après injection *in vivo* a été investigué de manière extensive. Des cellules satellites ont été injectées dans plusieurs modèles animaux d'infarctus et on a pu montrer que cela améliorerait la fonction cardiaque (Al Attar 2003; Blatt 2003; Horackova 2004; Scorsin 2000). Des essais cliniques chez des patients subissant en même temps des pontages coronariens ont été initiés et l'injection chez un patient de ses propres cellules satellites dans le myocarde lésé semble également améliorer la fonction (Menasche 2001; Menasche 2003; Siminiak 2004; Zhang 2003a). Cependant, aucune évidence de changement de phénotype de squelettique à cardiaque n'a pu être démontrée (Dorfman 1998; Reinecke 2002). Les myotubes intracardiaque formés après injection de cellules satellite ne sont pas connectés avec les cardiomyocytes environnants (Leobon 2003) ou alors très rarement (Rubart 2004). Donc, les cellules satellites améliorent la fonction cardiaque par d'autres mécanismes, comme par exemple via une amélioration passive de la tension de paroi ventriculaire, via la limitation de l'expansion de la cicatrice due à l'infarctus ou du remodelage de la matrice extracellulaire.

In vitro, Winitzky *et al.* (Winitzky 2005) ont isolé du muscle squelettique une population de cellules souches distinctes des cellules satellites. Ces cellules sont négatives pour les marqueurs de cellules souches Sca-1 et c-kit mais peuvent proliférer en suspension. Elles sont capables d'exprimer des marqueurs cardiaques et de se différencier *in vitro* en cardiomyocytes contractiles qui contiennent des transients calciques et des PA. Puisque aucune transdifférenciation des cellules satellite vers un phénotype cardiaque n'a été observée, cette nouvelle population de cellules souche pourrait représenter une alternative intéressante.

G.3 Cellules souches cardiaques

Les scientifiques ont toujours pensé que le cœur des mammifères était post-mitotique et ne contenait pas de cellules souches, surtout car le cœur est incapable de se régénérer après une blessure. En effet, suite à un infarctus, les cardiomyocytes morts sont remplacés par un tissu cicatriciel fibrotique et akinétique. Cependant, quelques équipes de recherche clament depuis des années que les cellules cardiaques sont encore capables de se diviser dans le cœur adulte, même si cela arrive très peu fréquemment (Beltrami 2001; Reiss 1994). Suite à ces résultats, des tentatives ont été effectuées pour isoler des cellules souches cardiaques à partir de cœurs adultes.

Plusieurs groupes ont rapporté l'isolation de population de cellules souches à partir de cœurs post-nataux en utilisant des techniques ou des marqueurs de surface utilisés précédemment pour isoler des cellules souches à partir d'autres organes. Par exemple, certaines cellules souches expriment le gène "multi-drug resistance" (MDRG) et sont appelées "Side Population" (SP), car elles ont la propriété d'exclure activement le colorant Hoechst de leur cytoplasme, ce qui permet de les séparer des autres cellules par cytométrie de flux. Chez la souris, des cellules SP isolées de myocarde peuvent se différencier en colonies de cellules contractiles *in vitro* lorsqu'elles sont cultivées avec des cardiomyocytes primaires de rat (Hierlihy 2002). Oh *et al.* (Oh 2003; Oh 2004) ont montré que des cellules SP isolées du cœur expriment à leur surface une nouvelle combinaison de marqueurs jamais observée sur d'autres types de cellules souches avant: elles sont positives pour Sca-1, CD31 et CD38, ce qui confirme qu'elles ne sont ni des CSH, ni des cellules endothéliales précurseurs ou matures. Elles ont également une télomérase active et elles expriment des facteurs de transcription cardiaques comme MEF2C, GATA-4 et TEF-1. *In vitro*, le traitement de ces cellules avec de la 5-azacytidine induit l'expression de Nkx2.5 et de protéines sarcomériques. De plus, après injection dans un modèle d'infarctus chez la souris, ces cellules sont retrouvées dans le myocarde et commencent de se différencier à la périphérie de la zone infarctée. Après injection dans un embryon de souris au stade blastocyste, un chimérisme est observé dans le cœur de 33% des animaux (Oh 2004). Récemment ont également été trouvées dans le cœur des cellules précurseurs cardiaques exprimant Sca-1 qui prolifèrent *in vitro* et peuvent se différencier en cardiomyocytes après 3 semaines dans un milieu contenant, entre autre, de la dexaméthasone, du β -glycérophosphate et de l'acide ascorbique (Rosenblatt-Velin 2005). Dans ces conditions, 5% des cellules expriment la Troponine I et deviennent contractiles. De plus, le FGF2 semble nécessaire dans ce processus, car des cellules positives pour Sca-1 isolées de cœur de souris déficientes pour le gène du FGF2 ne se différencient pas en cardiomyocytes contractiles.

Une autre approche a été développée pour isoler de potentielles cellules souches cardiaques de cœurs humains et de souris (Messina 2004). Lorsque des bouts de tissus cardiaques sont mis en culture, des cellules sont capables de migrer au dehors et de former des agrégats appelés cardiosphères. Ces cellules prolifèrent pendant plus de 50 jours *in vitro* et se mettent à battre spontanément. Un autre marqueur de cellules souches, c-kit, a également été utilisé afin d'identifier tout d'abord des cellules souches cardiaques *in vivo* chez le rat et de les purifier (Beltrami 2003). Des cellules clonogéniques positives pour c-kit ont été identifiées. Elles peuvent se différencier en cellules cardiaques, de muscle lisse et endothéliales *in vitro* et *in vivo*, après injection dans la zone périphérique d'un infarctus. Les mêmes cellules positives pour c-kit ont été trouvées *in vivo* dans le cœur humain et leur nombre est apparemment augmenté quand le cœur est hypertrophié (Urbanek 2003). Les mêmes auteurs ont récemment rapporté que des cœurs adultes ayant subi un infarctus contiennent plus de cellules souches cardiaques que des cœurs sains, que ce soit peu de temps ou longtemps après l'infarctus, et que ces cellules positives pour c-kit ont des télomères plus courtes et sont plus souvent positives pour des marqueurs d'apoptose ou de sénescence (Urbanek 2005).

Récemment, un rôle important dans la différenciation cardiaque a été attribué à *Isl1*, un facteur de transcription connu pour jouer un rôle dans la différenciation des îlots de Langerhans, car les souris déficientes pour ce gène ne développent pas de voie efférente, d'oreillette et de ventricule droit (Cai 2003). *Isl1* est exprimé également dans quelques cellules du cœur post-natal et a donc été utilisé pour isoler des cellules souches cardiaques chez le rat, la souris et l'homme. Les résultats montrent que le cœur adulte contient une population de cellules positives pour *Isl1* dont 25% sont capables de se différencier *in vitro* en cardiomyocytes après coculture avec des cardiomyocytes néonataux (Laugwitz 2005).

Puisque plusieurs groupes de recherche ont isolé des cellules souches cardiaques en utilisant différents protocoles et différents marqueurs de surface, il n'est pas encore possible de savoir s'ils ont tous isolé la même population et, donc, de dire avec certitude qu'il y a une unique population de cellules souches cardiaques. Cependant, certaines conditions sont communes à tous les protocoles, comme la présence de basses concentrations de FBS dans le milieu et le besoin de cellules nourricières de type fibroblastique ou mésenchymateuses pour la propagation.

En résumé, des études récentes suggèrent la présence de cellules souches cardiaques résidentes dans le cœur adulte. Bien qu'insuffisantes et inefficaces pour réparer le cœur en cas de pathologie, leur recrutement au moyen de facteurs de croissance et/ou leur propagation *ex-vivo* avant réinjection pourrait représenter une option thérapeutique également.

G.4 Leçons tirées des modèles de cellules souches adultes

En tout et pour tout, il existe peu d'études qui démontrent de manière convaincante des phénomènes de transdifférenciation de cellules souches adultes à cardiomyocytes *in vitro*. La quantité de cellules cardiaques obtenues est bien plus faible qu'à partir de CSE et peu de ces études fournissent une caractérisation fonctionnelle des cellules obtenues. Néanmoins, plusieurs groupes ont observé la réexpression de marqueurs cardiaques et leurs cellules pourraient donc avoir juste commencé le processus de différenciation cardiaque. D'autres études sont requises afin de déterminer si on peut pousser ces cellules à se développer en cardiomyocytes pleinement fonctionnels en utilisant des facteurs pro-cardiogéniques comme ceux résumés sur les Figures 1 et 3.

Pour atteindre ce but, une meilleure compréhension de la biologie fondamentale des cellules souches adultes est nécessaire. La plupart des populations de cellules souches adultes étudiées à ce jour sont hétérogènes, c'est-à-dire qu'elles contiennent des cellules de phénotypes différents ou exprimant différents marqueurs de surface. La production d'anticorps spécifiques qui permettraient de sélectionner positivement ces cellules souches est également nécessaire. D'autre part, plusieurs équipes essaient de travailler à un niveau clonal, c'est-à-dire à partir d'une lignée cellulaire dérivée d'une seule cellule. Ceci afin de prouver qu'une seule cellule a bien le potentiel de se différencier dans des phénotypes attendus selon son origine et des phénotypes inattendus. Répondre à ce type de questions est d'une réelle importance, car certaines cellules souches adultes pourraient avoir un potentiel de différenciation plus large que d'autres.

H. Conclusion

Les cellules souches dérivées d'embryons sont un outil unique qui permet d'étudier la cardiogenèse *in vitro*. Beaucoup de progrès ont été effectués dans notre compréhension des mécanismes de différenciation cardiaque, spécialement en ce qui concerne le rôle et l'effet de certains facteurs de croissance. Les cardiomyocytes dérivés de CECs, de CSEs et de CSEh ont été caractérisés fonctionnellement et structuralement et nous savons maintenant que leur développement récapitule la cardiogenèse précoce, mais que leur stade de maturation reste, pour la plupart des caractéristiques, à un stade embryonnaire. La quantité de cardiomyocytes obtenus est suffisante pour des études *in vitro*. Néanmoins, augmenter l'efficacité de la différenciation avec des facteurs de croissance est nécessaire si on veut obtenir assez de cellules cardiaques pour la thérapie cellulaire. De meilleures procédures sont également requises pour purifier les cellules, car le potentiel des CSE de former des tératomes ne doit pas être oublié. D'autres études devront aussi déterminer comment les cellules, différenciées ou non, répondent à l'environnement après implantation *in vivo* tout d'abord dans des modèles animaux, d'un point de vue fonctionnel et immunologique.

Le potentiel des cellules souches adultes de générer des cardiomyocytes *in vitro* est encore investigué de manière active en ce moment. Il n'y a pas encore de consensus quand à savoir quelles cellules souches adultes ont le potentiel de se différencier en cardiomyocytes. Cependant, les connaissances acquises en étudiant les CSE aideront sûrement à pousser la différenciation cardiaque des cellules souches adultes.

Les cellules souches adultes autologues sont une source de cellule à considérer très sérieusement pour la thérapie cellulaire, car leur utilisation réglerait un certain nombre de problèmes soulevés par la transplantation de cellules dérivées de CSE, comme le rejet immunitaire et le risque de formation de tératomes.

De futures études sur les cellules souches au moyen d'analyses génomiques et protéomiques de large échelle aideront sûrement à découvrir des molécules qui régulent les processus de différenciation. D'autres champs de recherche pour lesquels les cellules souches pourraient permettre de répondre à des questions cruciales incluent le reprogrammage du génome et le contrôle des modifications épigénétiques. L'effet de la sous- ou surexpression de gènes de type sauvage ou mutés dans certaines maladies humaines pourra aussi être étudié en utilisant ces modèles de cellules souches. Des études pharmaceutiques sur les CSE seront également utiles afin de déterminer la sûreté ou la teratogénicité de substances chimiques ou de médicaments.

La recherche sur les CSE et la recherche sur les cellules souches adultes sont complémentaires. A ce point de nos connaissances, aucune option ne doit être négligée,

car l'usage de cardiomyocytes dérivés de cellules souches adultes pour la thérapie cellulaire cardiaque supprimerait les problèmes de rejet immunitaire et éthiques, deux points de controverse qui sont contre l'utilisation de CSE pour ces applications cliniques. La recherche sur ces deux grandes classes de cellules devrait progresser en parallèle afin de mener éventuellement au développement de traitements efficaces de l'insuffisance cardiaque par thérapie cellulaire.

I. Références bibliographiques

- Agbulut O, Menot ML, Li Z, Marotte F, Paulin D, Hagege AA, Chomienne C, Samuel JL, Menasche P (2003) Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 58:451-9
- Al Attar N, Carrion C, Ghostine S, Garcin I, Vilquin JT, Hagege AA, Menasche P (2003) Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* 58:142-8
- Ali NN, Xu X, Brito-Martins M, Poole-Wilson PA, Harding SE, Fuller SJ (2004) Beta-adrenoceptor subtype dependence of chronotropy in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 99:382-91
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-73
- Bader A, Gruss A, Hollrigl A, Al-Dubai H, Capetanaki Y, Weitzer G (2001) Paracrine promotion of cardiomyogenesis in embryoid bodies by LIF modulated endoderm. *Differentiation* 68:31-43
- Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK (2005) The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 38:495-503
- Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI (1996) Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 223:691-4
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668-73
- Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J (2001) The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:519-24
- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J (1999) The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 265:134-9

- Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M (2002) Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J* 16:1558-66
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763-76
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344:1750-7
- Black BL, Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:167-96.
- Blatt A, Robinson D, Cotter G, Efrati S, Simantov Y, Bar I, Kaluski E, Krakover R, Sidenko S, Evron Z, Lipa L, Posternak N, Nevo Z, Vered Z (2003) Improved regional left ventricular function after successful satellite cell grafting in rabbits with myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 5:751-7
- Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K (1999) Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 43:675-84
- Boheler KR, Crider DG, Tarasova Y, Maltsev VA (2005) Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Methods Mol Med* 108:417-35
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91:189-201
- Bost F, Caron L, Marchetti I, Dani C, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B (2002) Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* 361:621-7
- Brand T (2003) Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258:1-19
- Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S (2003) *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5:877-89
- Camargo FD, Chambers SM, Goodell MA (2004) Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif* 37:55-65
- Cao F, Niu LL, Meng L, Zhao LX, Zheng M, Yue W, Bai CX, Jia GL, Pei XT (2004) [Cardiomyocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells after exposure of 5-azacytidine in vitro]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 37:118-24
- Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP (2004) Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94:92-5

- Choi SC, Yoon JH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS (2004) 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Exp Mol Med* 36:515-523
- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G (1997) Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 11):1279-85
- Davidson SM, Morange M (2000) Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes. *Dev Biol* 218:146-60
- Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M (2003) Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circ Res* 93:414-20
- Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P (2002) The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170:73-82
- Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G, Zimmer HG (2005) Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 65:52-63
- Dinsmore J, Ratliff J, Deacon T, Pakzaban P, Jacoby D, Galpern W, Isacson O (1996) Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 5:131-43
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45
- Doevendans PA, Kubalak SW, An RH, Becker DK, Chien KR, Kass RS (2000) Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32:839-51
- Dono R, Scalera L, Pacifico F, Acampora D, Persico MG, Simeone A (1993) The murine *cripto* gene: expression during mesoderm induction and early heart morphogenesis. *Development* 118:1157-68
- Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, Pelletier MP, Shum-Tim D, Li C, Chiu RC (1998) Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116:744-51
- Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW (2004) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22:53-4
- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M (1997) The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J* 16:5687-96.
- Edwards MK, Harris JF, McBurney MW (1983) Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol Cell Biol* 3:2280-6
- Edwards MK, McBurney MW (1983) The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Dev Biol* 98:187-91

- Eisenberg CA, Eisenberg LM (1999) WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. *Dev Dyn* 216:45-58
- Eisenberg CA, Gourdie RG, Eisenberg LM (1997) Wnt-11 is expressed in early avian mesoderm and required for the differentiation of the quail mesoderm cell line QCE-6. *Development* 124:525-36
- Eisenberg LM, Burns L, Eisenberg CA (2003) Hematopoietic cells from bone marrow have the potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274:870-82
- Eriksson M, Leppa S (2002) Mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 are required for proliferation and cardiomyocyte differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 277:15992-6001
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6
- Evans SM (1999) Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 10:73-83.
- Fijnvandraat AC, Lekanne Deprez RH, Christoffels VM, Ruijter JM, Moorman AF (2003) TBX5 overexpression stimulates differentiation of chamber myocardium in P19C16 embryonic carcinoma cells. *J Muscle Res Cell Motil* 24:211-8
- Fishman MC, Chien KR (1997) Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 124:2099-117.
- Foley A, Mercola M (2004) Heart induction: embryology to cardiomyocyte regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 14:121-5
- Foley AC, Mercola M (2005) Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev* 19:387-96
- Foshay K, Rodriguez G, Hoel B, Narayan J, Gallicano GI (2005) JAK2/STAT3 directs cardiomyogenesis within murine embryonic stem cells in vitro. *Stem Cells* 23:530-43
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-74
- Gadue P, Huber TL, Nostro MC, Kattman S, Keller GM (2005) Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp Hematol* 33:955-64
- Gassanov N, Er F, Zagidullin N, Hoppe UC (2004) Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *Faseb J* 18:1710-2
- Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Mahimainathan L, Chandrasekar B, Choudhury GG (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced myocyte enhancer factor 2A-dependent transcription of BMP-2 gene in cardiomyocyte precursor cells. *J Biol Chem* 278:21998-2005
- Gianakopoulos PJ, Skerjanc IS (2005) Hedgehog signaling induces cardiomyogenesis in P19 cells. *J Biol Chem* 280:21022-8

- Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11:367-8
- Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A (2003) In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 288:51-9
- Grepin C, Nemer G, Nemer M (1997) Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 124:2387-95
- Guan K, Furst DO, Wobus AM (1999) Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Eur J Cell Biol* 78:813-23
- Habara-Ohkubo A (1996) Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Struct Funct* 21:101-10
- Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S (2002) Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 105:380-6
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13:69-80
- He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003) Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93:32-9
- Hidai C, Masako O, Ikeda H, Nagashima H, Matsuoka R, Quertermous T, Kasanuki H, Kokubun S, Kawana M (2003) FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. *J Mol Cell Cardiol* 35:421-5
- Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA (2002) The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 530:239-43
- Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2001) Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28:276-80
- Hoffman LM, Carpenter MK (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:699-708
- Horackova M, Arora R, Chen R, Armour JA, Cattini PA, Livingston R, Byczko Z (2004) Cell transplantation for treatment of acute myocardial infarction: unique capacity for repair by skeletal muscle satellite cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1599-608
- Hosoda T, Monzen K, Hiroi Y, Oka T, Takimoto E, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2001) A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes. *J Biol Chem* 276:35978-89

- Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H, Nakahata T (2005) Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *Faseb J* 19:371-8
- In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22:1338-45
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6:88-95
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-402
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-9
- Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Anversa P (2005) Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 96:127-37
- Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL, 2nd (2004) Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2002) High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* 91:659-61
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108:407-14
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2004) Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22:1282-9
- Keller G (2005) Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19:1129-55
- Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. (1964) Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 24:1544-51
- Klinz F, Bloch W, Addicks K, Hescheler J (1999) Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase blocks development of functional embryonic cardiomyocytes. *Exp Cell Res* 247:79-83

- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98:216-24
- Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200:123-35
- Kolossov E, Lu Z, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J, Fleischmann BK (2005) Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *Faseb J* 19:577-9
- Kouskoff V, Lacaud G, Schwantz S, Fehling HJ, Keller G (2005) Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13170-5
- Kumar D, Sun B (2005) Transforming growth factor-beta2 enhances differentiation of cardiac myocytes from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 332:135-41
- Lakshmipathy U, Verfaillie C (2005) Stem cell plasticity. *Blood Rev* 19:29-38
- Lapidos KA, Chen YE, Earley JU, Heydemann A, Huber JM, Chien M, Ma A, McNally EM (2004) Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest* 114:1577-85
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433:647-53
- Lawrenz B, Schiller H, Willbold E, Ruediger M, Muhs A, Esser S (2004) Highly sensitive biosafety model for stem-cell-derived grafts. *Cytotherapy* 6:212-22
- Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S (2003) Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7808-11
- Li J, Puceat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, Krause KH, Jaconi ME (2002) Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biol* 158:103-13
- Lickert H, Kutsch S, Kanzler B, Tamai Y, Taketo MM, Kemler R (2002) Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* 3:171-81
- Liu H, Harris TM, Kim HH, Childs G (2005) Cardiac myocyte differentiation: the Nkx2.5 and Cripto target genes in P19 clone 6 cells. *Funct Integr Genomics* 5:219-39

- Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X, Hu C (2003) Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res* 58:460-8
- Logan M, Mohun T (1993) Induction of cardiac muscle differentiation in isolated animal pole explants of *Xenopus laevis* embryos. *Development* 118:865-75
- Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X (1996) Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Dev Biol* 178:198-202
- Lough J, Sugi Y (2000) Endoderm and heart development. *Dev Dyn* 217:327-42
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103:697-705
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993) Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44:41-50
- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J (1994) Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75:233-44
- Manabe K, Miake J, Sasaki N, Furuichi H, Yano S, Mizuta E, Yamamoto Y, Hoshikawa Y, Yamazaki H, Tajima F, Shiota G, Nanba E, Ohgi S, Hidaka K, Morisaki T, Kurata Y, Lee JK, Igawa O, Shigemasa C, Hisatome I (2004) Developmental changes of Ni(2+) sensitivity and automaticity in Nkx2.5-positive cardiac precursor cells from murine embryonic stem cell. *Circ J* 68:724-6
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 9:1195-201
- Martin GR, Evans MJ (1974) The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2:163-72
- Martin GR, Evans MJ (1975) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1441-5
- Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, Akazawa H, Molkenkin JD, Kasanuki H, Komuro I (2004) Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol* 167:351-63
- McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, Anderson PJ (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299:165-7
- McBurney MW, Rogers BJ (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 89:503-8

- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-80
- Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D (2003) Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41:1078-83
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A (2004) Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart. *Circ Res* 95:911-921
- Metzger JM, Lin WI, Samuelson LC (1994) Transition in cardiac contractile sensitivity to calcium during the in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 126:701-11
- Meyer N, Jaconi M, Landopoulou A, Fort P, Puceat M (2000) A fluorescent reporter gene as a marker for ventricular specification in ES-derived cardiac cells. *FEBS Lett* 478:151-8
- Miller-Hance WC, LaCorbiere M, Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien KR (1993) In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *J Biol Chem* 268:25244-52
- Molkentin JD (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275:38949-52.
- Monzen K, Hiroi Y, Kudoh S, Akazawa H, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Kawabata M, Miyazono K, Ishii S, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2001) Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol* 153:687-98
- Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I (1999) Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* 19:7096-105
- Monzen K, Zhu W, Kasai H, Hiroi Y, Hosoda T, Akazawa H, Zou Y, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Komuro I (2002) Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 298:493-500
- Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M (2000) GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *Embo J* 19:2046-55.
- Mummery C, Ward D, van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Opthof T, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, van der Heyden M, Pera M (2002) Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat* 200:233-42

- Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-40
- Mummery CL, van Achterberg TA, van den Eijnden-van Raaij AJ, van Haaster L, Willemsse A, de Laat SW, Piersma AH (1991) Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells. *Differentiation* 46:51-60
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664-8
- Muthuchamy M, Pajak L, Howles P, Doetschman T, Wieczorek DF (1993) Developmental analysis of tropomyosin gene expression in embryonic stem cells and mouse embryos. *Mol Cell Biol* 13:3311-23
- Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S (2004) Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2670-6
- Naito AT, Tominaga A, Oyamada M, Oyamada Y, Shiraishi I, Monzen K, Komuro I, Takamatsu T (2003) Early stage-specific inhibitions of cardiomyocyte differentiation and expression of Csx/Nkx-2.5 and GATA-4 by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Exp Cell Res* 291:56-69
- Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD (2003) A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5834-9
- Ng WA, Doetschman T, Robbins J, Lessard JL (1997) Muscle isoactin expression during in vitro differentiation of murine embryonic stem cells. *Pediatr Res* 41:285-92
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10:494-501
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12313-8
- Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Schwartz RJ, Entman ML, Schneider MD (2004) Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1015:182-9
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001a) Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 938:221-9; discussion 229-30

- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001b) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001c) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10344-9
- Otsu K, Kuruma A, Yanagida E, Shoji S, Inoue T, Hirayama Y, Uematsu H, Hara Y, Kawano S (2005) Na⁺/K⁺ ATPase and its functional coupling with Na⁺/Ca²⁺ exchanger in mouse embryonic stem cells during differentiation into cardiomyocytes. *Cell Calcium* 37:137-51
- Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M (2002) Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418:636-41
- Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J (2002) Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9550-5
- Parisi S, D'Andrea D, Lago CT, Adamson ED, Persico MG, Minchiotti G (2003) Nodal-dependent Cripto signaling promotes cardiomyogenesis and redirects the neural fate of embryonic stem cells. *J Cell Biol* 163:303-14
- Passier R, Oostwaard DW, Snapper J, Kloots J, Hassink RJ, Kuijk E, Roelen B, de la Riviere AB, Mummery C (2005) Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 23:772-80
- Peng CF, Wei Y, Levsky JM, McDonald TV, Childs G, Kitsis RN (2002) Microarray analysis of global changes in gene expression during cardiac myocyte differentiation. *Physiol Genomics* 9:145-55
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ (1995) Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4857-61
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7
- Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Jr., Valiunas V, Qu J, Doronin S, Zuckerman J, Shlapakova IN, Gao J, Pan Z, Herron AJ, Robinson RB, Brink PR, Rosen MR, Cohen IS (2004) Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res* 94:952-9
- Puceat M, Jaconi M (2005) Ca²⁺ signalling in cardiogenesis. *Cell Calcium* 38:383-9
- Qu CK, Feng GS (1998) Shp-2 has a positive regulatory role in ES cell differentiation and proliferation. *Oncogene* 17:433-9
- Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G, Abedi M (2005) Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol* 33:389-94

- Rastan AJ, Walther T, Kostelka M, Garbade J, Schubert A, Stein A, Dhein S, Mohr FW (2005) Morphological, electrophysiological and coupling characteristics of bone marrow-derived mononuclear cells-an in vitro-model. *Eur J Cardiothorac Surg* 27:104-10
- Reinecke H, Poppa V, Murry CE (2002) Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 34:241-9
- Reiss K, Kajstura J, Zhang X, Li P, Szoke E, Olivetti G, Anversa P (1994) Acute myocardial infarction leads to upregulation of the IGF-1 autocrine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes. *Exp Cell Res* 213:463-72
- Reppel M, Boettinger C, Hescheler J (2004) Beta-adrenergic and muscarinic modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 14:187-96
- Reyes M, Verfaillie CM (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938:231-3; discussion 233-5
- Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P, Doetschman T (1990) Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem* 265:11905-9
- Rodriguez ER, Tan CD, Onwuta US, Yu ZX, Ferrans VJ, Parrillo JE (1994) 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine induces cardiac myocyte differentiation but not neuronal differentiation in P19 teratocarcinoma cells in a dose dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 205:652-8
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21:105-10
- Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Cartoni C, Beermann F, Pedrazzini T (2005) FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 115:1724-33
- Rubart M, Soonpaa MH, Nakajima H, Field LJ (2004) Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* 114:775-83
- Rudnicki MA, Jackowski G, Saggin L, McBurney MW (1990) Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells. *Dev Biol* 138:348-58
- Rudy-Reil D, Lough J (2004) Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *Circ Res* 94:e107-16
- Ryan K, Chin AJ (2003) T-box genes and cardiac development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:25-37

- Sachinidis A, Gissel C, Nierhoff D, Hippler-Altenburg R, Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2003) Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. *Cell Physiol Biochem* 13:423-9
- Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T, Robbins J (1991) Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study. *J Biol Chem* 266:22419-26
- Satin J, Kehat I, Caspi O, Huber I, Arbel G, Izhaki I, Magyar J, Schroder EA, Perlman I, Gepstein L (2004) Mechanism of Spontaneous Excitability in Human Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *J Physiol* 559 (Pt 2):479-96
- Sauer H, Neukirchen W, Rahimi G, Grunheck F, Hescheler J, Wartenberg M (2004) Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 294:313-24
- Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M (2000) Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett* 476:218-23
- Schier AF, Shen MM (2000) Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403:385-9
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000) Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11307-12
- Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P (2000) Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:1169-75
- Siminiak T, Kalawski R, Fiszler D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M (2004) Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 148:531-7
- Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55-62
- Skerjanc IS, Petropoulos H, Ridgeway AG, Wilton S (1998) Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells. *J Biol Chem* 273:34904-10
- Smith SC, Reuhl KR, Craig J, McBurney MW (1987) The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *J Cell Physiol* 131:74-84
- Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, Livne E, Gepstein L (2003) Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2355-63
- Srivastava D, Olson EN (2000) A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407:221-6.

- Suk Kim H, Hidaka K, Morisaki T (2003) Expression of ErbB receptors in ES cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 309:241-6
- Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT (2003) Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107:1912-6
- Takeda Y, Mori T, Imabayashi H, Kiyono T, Gojo S, Miyoshi S, Hida N, Ita M, Segawa K, Ogawa S, Sakamoto M, Nakamura S, Umezawa A (2004) Can the life span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? *J Gene Med* 6:833-45
- Taylor SM, Jones PA (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17:771-9
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-5
- Terami H, Hidaka K, Katsumata T, Iio A, Morisaki T (2004) Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325:968-75
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105:93-8
- Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P (2003) Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10440-5
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P (2005) Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8692-97
- van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y, Rook MB, Jongsma HJ, Opthof T (2003) P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardiovasc Res* 58:410-22
- van Tuyn J, Knaan-Shanzer S, van de Watering MJ, de Graaf M, van der Laarse A, Schalij MJ, van der Wall EE, de Vries AA, Atsma DE (2005) Activation of cardiac and smooth muscle-specific genes in primary human cells after forced expression of human myocardin. *Cardiovasc Res* 67:245-55
- Ventura C, Maioli M (2000) Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ Res* 87:189-94

- Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A (2004) Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 279:23574-9
- Wagers AJ, Weissman IL (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116:639-48
- Wang Z, Cohen K, Shao Y, Mole P, Dombkowski D, Scadden DT (2004) Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes, and blood vessels. *Blood* 103:100-9
- Wheatley SC, Isacke CM, Crossley PH (1993) Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development* 119:295-306
- Winitzky SO, Gopal TV, Hassanzadeh S, Takahashi H, Gryder D, Rogawski MA, Takeda K, Yu ZX, Xu YH, Epstein ND (2005) Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes in vitro. *PLoS Biol* 3:e87
- Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM (1997) Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29:1525-39
- Wobus AM, Kleppisch T, Maltsev V, Hescheler J (1994) Cardiomyocyte-like cells differentiated in vitro from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca²⁺ channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A:425-34
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991) Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48:173-82
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364:141-8
- Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG (2004) Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc* 126:1590-1
- Xu C, Liguori G, Adamson ED, Persico MG (1998) Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev Biol* 196:237-47
- Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91:501-8
- Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y (2004) Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:623-31

- Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E, Tomaselli GF, Li RA (2005) Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 111:11-20
- Yang Y, Min JY, Rana JS, Ke Q, Cai J, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF (2002) VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. *J Appl Physiol* 93:1140-51
- Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW (2005) Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115:326-38
- Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami SI, Shimazaki T, Okano H, Ogawa S, Fukuda K (2005) Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:607-611
- Zhang F, Chen Y, Yang Z, Gao X, Ma W, Li C, Kao RL (2003a) Cellular cardiomyoplasty for a patient with heart failure. *Cardiovasc Radiat Med* 4:43-6
- Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET (2004) Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 110:3803-7
- Zhang YM, Shang L, Hartzell C, Narlow M, Cribbs L, Dudley SC, Jr. (2003b) Characterization and regulation of T-type Ca²⁺ channels in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2770-9
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28