

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
ABREVIATIONS.....	7
ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	9
ETAT DES LIEUX.....	11
I. TRANSPOSITION DES GROS VAISSEAUX.....	11
A. APERÇU GENERAL.....	11
B. OPTIONS THERAPEUTIQUES.....	11
1. <i>Correction anatomique : « switch »</i>	12
2. <i>Correction physiologique : Mustard et Senning</i>	12
C. LIMITES TECHNIQUES.....	12
1. <i>Correction physiologique</i>	12
2. <i>Correction anatomique</i>	12
II. CARDIOMYOPLASTIE CELLULAIRE.....	14
A. RAPPELS.....	14
B. ETAT DE LA QUESTION : POINTS CLEFS ET REFERENCE.....	15
C. APPLICATION POTENTIELLE DANS LE VENTRICULE DROIT.....	16
BUT DE L'ETUDE.....	17
MATERIEL ET METHODES.....	18
I. ANIMAUX.....	18
II. SCHEMA EXPERIMENTAL.....	19
III. CULTURE CELLULAIRE.....	21
A. TECHNIQUE DE CULTURE.....	21
B. PRODUITS UTILISES.....	21
C. MILIEUX PREPARES PAR L'OPERATEUR.....	21

D.	BIOPSIE MUSCULAIRE	22
E.	DISSOCIATION MECANIQUE	22
F.	PREPARATION DES ENZYMES	23
G.	DIGESTION ENZYMATIQUE DES FRAGMENTS MUSCULAIRES.....	23
H.	FILTRATION ET PREPARATION FINALE	23
I.	MARQUAGE CELLULAIRE.....	23
J.	OBSERVATION DE MYOTUBES ET IMMUNOMARQUAGE	24
IV.	ANESTHESIE	24
A.	PREMEDICATION.....	24
B.	INDUCTION	25
C.	ENTRETIEN.....	25
V.	SOINS POSTOPERATOIRES	25
VI.	EVALUATION HEMODYNAMIQUE AVANT ET APRES	
L'ENTRAINEMENT.....		26
A.	TECHNIQUE D'EVALUATION	26
1.	<i>Etat mécanique stable</i>	<i>27</i>
2.	<i>Etat d'occlusion.....</i>	<i>27</i>
B.	METHODE DU CATHETER DE CONDUCTANCE	27
1.	<i>Introduction des principes.....</i>	<i>27</i>
2.	<i>Détermination des facteurs</i>	<i>29</i>
C.	VOIE D'ABORD	30
D.	MATERIEL UTILISE	31
E.	PROTOCOLE D'ACQUISITION	32
F.	TECHNIQUE CHIRURGICALE.....	33
1.	<i>Voie d'abord.....</i>	<i>33</i>
2.	<i>Cerclage de l'AP.....</i>	<i>33</i>
3.	<i>Préparation des cellules pour l'implantation myocardique</i>	<i>34</i>
4.	<i>Dispositif d'injection.....</i>	<i>34</i>
5.	<i>Injections intramyocardiques.....</i>	<i>34</i>
6.	<i>Fermeture du thorax.....</i>	<i>34</i>
VII.	AUTOPSIE, ANALYSE HISTOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHEMIE	35

VIII. ETUDE DES ANIMAUX DECEDES.....	36
IX. GESTION STATISTIQUE DES DONNEES	36
RESULTATS	37
I. EVOLUTION CLINIQUE DES AGNEAUX AU COURS DE L'ETUDE	37
II. PREPARATION CELLULAIRE SANS CULTURE	38
A. COMPTAGE CELLULAIRE.....	38
B. RICHESSE EN MYOBLASTES DES CULTURES TEMOINS.....	38
1. <i>Observation de myotubes</i>	38
2. <i>Méthode immunocytochimique</i>	39
C. MARQUAGE MEMBRANAIRE AVEC LE CMDII	41
III. EVALUATION FONCTIONNELLE.....	42
A. REALISATION DE L'EXAMEN HEMODYNAMIQUE / ACQUISITION DES COURBES PRESSION- VOLUME	42
B. RESULTATS	44
1. <i>Pression développée (DP developed pressure)</i>	45
2. <i>dP maximale (Max dP/dt)</i>	46
3. <i>dP minimale (Min dP/dt)</i>	47
4. <i>travail d'éjection (SW stroke work)</i>	48
5. <i>pente de PRSW (S-PRSW Preload Recrutable Stroke Work Slope)</i>	49
IV. ANATOMO-PATHOLOGIE.....	50
A. OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES.....	50
B. ANALYSE HISTOLOGIQUE	50
DISCUSSION	54
I. PREPARATION CELLULAIRE ISSUE DU MUSCLE SQUELETTIQUE ET RESULTATS HISTOLOGIQUES	54
II. MODE D'ADMINISTRATION DES CELLULES.....	56
III. MARQUAGE.....	57

IV. MODELE DE PREPARATION AVANT « SWITCH ».....	58
V. METHODOLOGIE ET RESULTATS DES COURBES PRESSION-VOLUME... 58	
CONCLUSION.....	60
PERSPECTIVES.....	61
REFERENCES.....	62

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1: SCHEMA EXPERIMENTAL DE L'ETUDE « APPOINT DE LA CARDIOMYOPLASTIE CELLULAIRE A LA PREPARATION VENTRICULAIRE ».....	20
FIGURE 2: LES PRINCIPES DE MESURE DU CATHETER DE CONDUCTANCE	28
FIGURE 3: MODIFICATION DU SIGNAL DE VOLUME LORS D'UNE INJECTION DE SERUM SALE HYPERTONIQUE	30
FIGURE 4 : POSITION DU CATHETER MILLAR ET DU CATHETER SWANN-GANZ DANS LE VD	32
FIGURE 5: OBSERVATION DE MYOTUBES DANS LES CULTURES TEMOINS (x400).....	39
FIGURE 6: CARACTERISATION AVEC MYOD D'UNE CULTURE TEMOIN (PANNEAU INFERIEUR, NOYAUX EN VERT). LE PANNEAU SUPERIEUR EST UNE SUPERPOSITION D'UNE ACQUISITION EN CONTRASTE DE PHASE ET DU MARQUAGE DAPI (NOYAUX EN BLEU), PERMETTANT D'INDIVIDUALISER TOUS LES NOYAUX.....	40
FIGURE 7: MARQUAGE FLUORESCENT DES MEMBRANES AVEC LE CMDII DANS UNE CULTURE TEMOIN (x400).....	41
FIGURE 8: COURBES PRESSION-VOLUME (SUPERPOSEES) CHEZ UN ANIMAL A J0. NOTER L'ASPECT POINTU CARACTERISTIQUE DE CE GENRE DE COURBE DANS LE VENTRICULE DROIT	43
FIGURE 9: VISION LINEAIRE D'UNE COURBE DE PRESSION (BLEUE) ET DE 3 COURBES DE VOLUME (ROUGE, ROSE ET GRISE) AU MOMENT D'UNE OCCLUSION.....	43
FIGURE 10: COURBES PRESSION-VOLUME (SUPERPOSEES AU MOMENT D'UNE OCCLUSION) CHEZ UN ANIMAL A J0. NOTER LE DEPLACEMENT VERS LA GAUCHE ET VERS LE BAS LORS DE L'OCCLUSION.	44
FIGURE 11: PRESSION DEVELOPEE POUR LES TROIS GROUPES AVANT ET APRES 2 MOIS DE PREPARATION VENTRICULAIRE	45
FIGURE 12: MAX DP/DT POUR LES TROIS GROUPES AVANT ET APRES 2 MOIS DE PREPARATION VENTRICULAIRE.....	46
FIGURE 13: MIN DPDT POUR LES TROIS GROUPES AVANT ET APRES 2 MOIS DE PREPARATION VENTRICULAIRE.....	47
FIGURE 14: STROKE WORK (TRAVAIL D'EJECTION) POUR LES TROIS GROUPES AVANT ET APRES 2 MOIS DE PREPARATION VENTRICULAIRE	48
FIGURE 15: PENTE DE LA PRSW (PRELOAD RECRUITABLE STROKE WORK) POUR LES TROIS	

GROUPES AVANT ET APRES 2 MOIS DE PREPARATION VENTRICULAIRE	49
FIGURE 16: CELLULES MY32 POSITIVES (EN MARRON) DANS LE MYOCARDE DU VENTRICULE DROIT D'UN AGNEAU GREFFE AVEC UNE PREPARATION CELLULAIRE SANS CULTURE	52
FIGURE 17: CELLULES MARQUEES PAR LE CM β OBSERVEES EN FLUORESCENCE ROUGE DANS LES CRYOCOUPES DE DEUX ANIMAUX GREFFES	53
ÉQUATION 1	28
ÉQUATION 2	29
ÉQUATION 3	29
ÉQUATION 4	29

ABREVIATIONS

% : pourcent

µg : microgramme

µL : microlitre

µm: micromètre

AP : artère pulmonaire

bpm : battements par minute

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

CIA : communication inter-auriculaire

CIV : communication inter-ventriculaire

cm² : centimètre carré

cmDiI : Chloromethylbenzamide dérivé du DiI

DAPI : 4'-6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEMc: DMEM complété

DP : Developed pressure

g : gramme

h : heure

IM : intramusculaire

IV : intraveineuse

kg : kilogramme

m : mois

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

ni : non interprétable

OD : oreillette droite

OG : oreillette gauche

PBS : Phosphate Buffered Saline

Péni/strepto : Pénicilline/Streptomycine

PRSW : preload recruitable stroke work

SC : sous-cutanée

SVF : Sérum de veau foetal

SW : stroke work

t/min : tours par minute

TGV : transposition des gros vaisseaux

VD : ventricule droit

VG : ventricule gauche

INTRODUCTION

La cardiomyoplastie cellulaire se définit comme un apport de cellules myogéniques exogènes dans le myocarde pour suppléer aux cardiomyocytes disparus ou altérés. Elle a pour but de réparer, remplacer ou restituer une masse myocardique fonctionnelle et d'améliorer les performances contractiles du cœur. Depuis une quinzaine d'années, nombre d'équipes travaillent sur l'apport de cellules exogènes dans le myocarde. Les différents travaux portent, d'une part, sur la nature des cellules greffées. Différents types cellulaires ont été utilisés : fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, cellules de moelle osseuse ou encore cellules musculaires squelettiques. D'autre part, les études ont porté sur un aspect plus technique. Plusieurs méthodes de greffe ont été développées : principalement injections intra myocardiques versus injections endo coronaires. Enfin, l'impact du nombre de cellules exogènes greffées sur l'efficacité fonctionnelle de la greffe a fait l'objet de diverses publications. La cardiomyoplastie s'est révélée très prometteuse lorsqu'elle était réalisée sur des animaux qui présentaient une cardiomyopathie dilatée (CMD) et chez les animaux sur lesquels il a été provoqué une ischémie du myocarde.

Dans certaines malformations cardiaques congénitales chez l'homme, l'aorte naît du ventricule droit (VD) et l'artère pulmonaire (AP) naît du ventricule gauche (VG) : c'est la transposition des gros vaisseaux (TGV). Le traitement de choix est chirurgical et consiste à replacer l'aorte sur le VG et l'AP sur le VD, c'est le « switch ». Les résultats sont excellents sur les enfants opérés dans les 4 à 6 semaines qui suivent leur naissance. Si l'intervention n'est pas pratiquée dans ces délais, le VG, soumis à une pression sous pulmonaire voit sa masse diminuer et, au bout de 2 mois, il n'est plus capable d'assurer une circulation systémique si un switch est réalisé. Il faut alors le reparer. C'est le cerclage de l'AP qui le permet en induisant une hypertrophie des cardiomyocytes.

Cette étude se propose d'étudier l'impact de la cardiomyoplastie cellulaire dans la préparation du ventricule sous pulmonaire chez l'agneau. Il n'existe pas de modèle ovin de TGV. Il n'est donc pas possible d'injecter des cellules dans un VG duquel naîtrait l'AP. Pour étudier les effets d'un apport de cellules musculaires squelettiques sur le ventricule soumis aux contraintes pulmonaires, il est nécessaire d'utiliser le VD.

Après avoir présenté un état des lieux sur la TGV dans l'espèce humaine et après avoir exposé une synthèse bibliographique sur la cardiomyoplastie cellulaire, ce travail suivra un plan expérimental classique dans lequel seront présentés les matériels et méthodes, résultats et discussion.

Ce travail est le fruit de la collaboration de différentes institutions : Institut Mutualiste Montsouris (IMM Recherche, département cardiovasculaire, département d'anatomopathologie), l'Unité de génétique moléculaire du développement de l'Institut Pasteur et le Service d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Européen Georges Pompidou.

Je n'ai pris part, ni à l'élaboration du schéma expérimental, ni aux interventions chirurgicales. Mon travail s'est concentré sur l'étude de la cardiomyoplastie cellulaire et la synthèse des résultats.

La technique de thérapie cellulaire avec une préparation cellulaire sans culture a fait l'objet d'un brevet mondial (Fondation de l'Avenir, Institut Pasteur, CNRS)

ETAT DES LIEUX

I. Transposition des gros vaisseaux

A. Aperçu général

La TGV est la malformation cyanogène la plus fréquente chez le nouveau-né. Son incidence dans la population générale est comprise entre 2 et 3 pour 10 000 naissances d'enfants vivants. Le plus souvent mortelle dans les premiers moments de la vie (50 % dans les premiers mois et 90 % dans les premières années), les formes diagnostiquées chez l'enfant sont rares et chez l'adulte exceptionnelles.

Chez un nouveau-né atteint d'une TGV, le VG sous pulmonaire est pendant les 3 ou 4 premières semaines de vie soumis à une contrainte importante en raison de résistances pulmonaires élevées. Pendant cette période initiale, le VG est donc apte à fournir une compétence systémique et la correction anatomique de cette malformation peut être réalisée.

Après un mois de vie, les résistances pulmonaires chutent, et parallèlement le ventricule sous pulmonaire voit sa masse diminuer par rapport à celle du VD, ce phénomène aboutit à deux conséquences :

- (1) le VG en pression sous pulmonaire est dépréparé et n'est physiologiquement plus capable faire face brusquement à un travail systémique.
- (2) le VD en pression systémique présentera à long terme des signes de défaillance. [57].

B. Options thérapeutiques

Face à un nouveau-né présentant une TGV, l'urgence première est d'amener un « mixing du sang » correct afin d'obtenir une saturation compatible avec la vie. Ce mixing est obtenu grâce à une communication entre les cavités gauches et droites. Si l'enfant présente une communication interauriculaire (CIA) de bonne taille, aucune manœuvre n'est nécessaire. Par contre s'il existe une CIA restrictive ou l'absence de CIA, il est indispensable d'en créer une. Cette intervention était réalisée par voie chirurgicale (Blalock et Hanlon)[11], elle est actuellement réalisée par cathétérisme selon la technique de Rashkind.

Le traitement de la TGV elle-même peut être réalisé de deux façons :

1. Correction anatomique : « switch »

C'est aujourd'hui la technique de choix[110]. Elle consiste à transposer l'aorte sur le VG et l'AP sur le VD et à repositionner les coronaires sur l'aorte[56].

Pour qu'une correction anatomique soit possible, il faut que le VG soit « préparé » à assurer une circulation à haute pression. En cas de TGV, cette situation existe en période néonatale puisque la pression ventriculaire gauche est élevée et la masse ventriculaire gauche normale. Passé la troisième semaine de vie le VG est « dépréparé » (baisse de la masse myocardique ventriculaire gauche, baisse de la pression ventriculaire gauche par chute des résistances artérielles pulmonaires) et incapable d'assurer une pression systémique.

2. Correction physiologique : Mustard et Senning

Cette intervention chirurgicale laisse persister la TGV et consiste à faire passer le sang non hématisé de l'oreillette droite (OD) au VG et le sang hématisé de l'oreillette gauche (OG) au VD. On est alors en présence d'une situation viable dans laquelle le sang amené au cœur par la veine cave est expulsé dans l'AP, vers les poumons, et celui provenant des veines pulmonaires est acheminé vers l'ensemble de l'organisme via l'aorte.

C. Limites techniques

1. Correction physiologique

La principale limite des interventions de Mustard et Senning est qu'elle laisse le VD en position systémique. A court et moyen terme, les résultats sont excellents. En revanche, à plus long terme, le VD présentera tôt ou tard des signes de défaillance.

2. Correction anatomique

La correction anatomique n'est possible que tant que le VG est apte à fournir une compétence systémique, c'est à dire tant qu'il est lui-même soumis à un régime élevé de pression. (premier mois de la vie, sténose pulmonaire)

En dehors de ces cas, le VG perd sa compétence et il faut alors le réparer. Chez le nouveau-né, une préparation consistant à soumettre le ventricule à des pressions élevées permet d'obtenir une augmentation de sa masse par un phénomène d'hyperplasie aboutissant à une augmentation du nombre de cellules. Passé quelques semaines, deux mois tout au plus, l'augmentation de la masse ventriculaire sera obtenue par une hypertrophie des cellules existantes et non par leur multiplication. [32,129]

En pratique, la préparation ventriculaire s'effectue aujourd'hui par un cerclage de l'AP. [23, 44].

II. Cardiomyoplastie cellulaire

A. Rappels

Les cardiomyocytes, passés les stades fœtaux du développement, perdent essentiellement leur faculté de prolifération. Malgré l'existence récemment découverte d'une population cellulaire participant à la régénération tissulaire myocardique (cellules souches d'origine médullaire ou cardiaque multipotentes) [3, 4, 9, 10, 45, 61, 89, 90], le cœur demeure incapable de mobiliser massivement ces cellules. De même, deux mois environ après la naissance, le cœur perd ses facultés de multiplication des cardiomyocytes natifs.

Le concept de cardiomyoplastie cellulaire repose ainsi sur un apport de cellules exogènes myogéniques dans le myocarde pour suppléer aux cardiomyocytes disparus ou altérés. Cette approche thérapeutique nouvelle dérive, d'une part, de la cardiomyoplastie dynamique, intervention utilisée aujourd'hui en pratique clinique pour le traitement des certaines cardiopathies sévères, où le muscle squelettique (grand dorsal) est utilisé comme assistance ventriculaire [17, 18], et d'autre part, des avancées récentes en matière de transplantation cellulaire.

A l'inverse du tissu myocardique, le tissu musculaire strié squelettique présente de fortes potentialités de régénération, grâce à la présence de cellules souches : les cellules satellites. Les cellules satellites sont des cellules myogéniques mononuclées issues des myoblastes embryonnaires. Elles sont accolées à la fibre musculaire striée, sous la lame basale et l'endomysium. Quiescentes à l'état normal chez l'adulte, elles peuvent être réactivées par des lésions chimiques, mécaniques ou par une dissociation enzymatique. Elles représentent 20% des noyaux musculaires chez le fœtus et 1 à 2% chez l'adulte [16, 31]. Ces caractéristiques de multiplication, leur origine embryonnaire mésodermique commune avec les cardiomyocytes ainsi que leur accessibilité dans tous les muscles squelettiques en font des cellules particulièrement étudiées pour la transplantation cellulaire dans le myocarde. Elles sont, en outre, très résistantes à l'ischémie.

B. Etat de la question : points clefs et référence

Pour ces cellules satellites ou pour les cellules d'autres origines tissulaires, les expériences menées jusqu'à présent ont varié par le modèle animal utilisé (petit animal essentiellement), le type de lésion induite (infarctus expérimental dans la grande majorité des cas), le mode de transplantation et le mode d'évaluation expérimental.

Les grandes étapes et conclusions issues de ces publications sont les suivantes :

1. Des cellules exogènes peuvent survivre et former des greffes stables dans le temps, à l'intérieur du myocarde sain ou pathologique : cardiomyocytes embryonnaires ou adultes [43, 59, 62, 64, 66, 97, 101, 102, 107, 127, 134], lignées cellulaires [50, 51], myoblastes d'origine musculaire squelettique [20, 27, 47, 71, 73, 80, 91, 92, 95, 98, 116, 119, 123, 133] ou lisse [63, 131, 132], cellules souches d'origine médullaire [41, 49, 54, 83, 84, 85, 86, 125, 126] ou embryonnaire [48].
2. Des greffes stables ont été obtenues en transplantation autologue [13, 20, 73, 88, 91, 119, 120, 126, 131, 132] ainsi qu'homologue [43, 52, 59, 62, 64, 66, 97, 101, 102, 107] et hétérologue [123] sur des animaux immunosupprimés.
3. Les cardiomyocytes greffés peuvent s'organiser et établir des jonctions intercellulaires entre eux et avec les cardiomyocytes environnants (gap junctions révélées par l'intermédiaire de la protéine connexine 43) [52, 97, 107, 123].
4. Des gap junctions ou des structures ressemblant à des disques intercalaires ont également été observées à plusieurs reprises au sein des myoblastes greffés, ainsi qu'entre les myoblastes et les cardiomyocytes environnants [20, 98, 115]. Ces résultats ne sont pas retrouvés par les autres équipes. Il est généralement admis aujourd'hui que les myoblastes ne prennent pas le phénotype cardiaque et ne créent pas de jonctions électriques avec les cardiomyocytes [96, 100].
5. Des prélèvements issus d'infarctus greffés avec des myoblastes embryonnaires peuvent se contracter ex vivo [80].
6. Des co-cultures de myoblastes et de cardiomyocytes ont révélé un couplage électromécanique ; les contractions synchrones de ces deux types cellulaires en boîtes de Pétri semblent indiquer que les myotubes n'ont pas d'automaticité propre mais répondent aux signaux d'origine cardiomyocytaire [94].
7. Des cellules souches stromales (dites adhérentes de la moelle) peuvent, en culture, être orientées vers la lignée cardiomyocytaire [29, 37, 70].

8. Des résultats fonctionnels extrêmement encourageants ont été rapportés ex vivo et in vivo, après transplantation de cellules exogènes, sur différents modèles de lésions cardiaques induites : infarctus du myocarde [40, 42, 43, 49, 62, 63, 65, 80, 86, 88, 91, 100, 101, 102, 117, 119, 121, 91] ou cardiomyopathie dilatée [13, 101, 117, 131, 132].

9. Les cellules ont été greffées par voie intramyocardique (la plupart des publications) ou endo-coronaire [98, 115, 117, 118, 120, 125].

10. Quelques publications font état, à ce jour, de l'application à l'homme de ces nouvelles stratégies thérapeutiques : greffe de myoblastes autologues [36, 73, 74, 75, 87, 103] ou de cellules souches de la moelle [109, 112, 122]. Après ces essais de phase I encourageants, des essais de phase II sont en cours.

11. Des cellules souches cardiaques ont été récemment identifiées. Ces cellules peuvent être isolées, cultivées et réimplantées dans le myocarde. Ces cellules peuvent donner naissance aux différentes populations cellulaires résidentes [3, 4, 9, 45, 90].

C. Application potentielle dans le ventricule droit

Puisqu'il est impossible d'obtenir une hyperplasie endogène lors de préparation ventriculaire avant Switch, en dehors de la période fœtale et néonatale, la réalisation d'une « hyperplasie exogène » par greffe cellulaire mériterait d'être tentée avec deux objectifs possibles :

- (1) Préparer un VG à une compétence systémique avant switch.
- (2) Augmenter la puissance d'un VD défaillant laissé en position systémique.

BUT DE L'ETUDE

Le but de l'étude que nous avons réalisée était ainsi d'évaluer les effets tissulaires et fonctionnels de la transplantation de cellules myo-satellites non-cultivées par voie intramyocardique, associée à une préparation du ventricule droit chez le gros animal.

Cette étude comportait les étapes suivantes :

- (1) Evaluation des effets hémodynamiques sur le ventricule droit

- (2) Etude histologique standard et immunohistochimique des cellules greffées sur ce même modèle : devenir cellulaire (expression d'un phénotype musculaire squelettique ou engagement dans une autre lignée cellulaire résidente), intégration à la structure native, étendue de la prise de greffe

MATERIEL ET METHODES

I. Animaux

Seize agneaux mâles Ile de France ont été inclus dans le protocole de préparation ventriculaire. Ces agneaux ont été achetés chez un fournisseur agréementé pour l'expérimentation animale (Lycée Agricole Crézancy, Crézancy, France). Cet élevage est garanti indemne de toute maladie légalement réputée contagieuse (MLRC). Les animaux ont été considérés comme sains à leur entrée en protocole après une inspection vétérinaire. Les animaux ont été par la suite hébergés dans la ferme de Bligny de la Fondation de l'Avenir (Fontenay les Briis), en bergerie paillée et en pâture restrictive. Elles ont été nourries avec foin et granulés et abreuvées ad libitum avec de l'eau propre à la consommation humaine. Les interventions (biopsie, culture, greffe et prélèvement final) ont eu lieu au Centre d'expérimentation et de recherche appliquée (CERA-IMM Recherche, Paris). Le projet a été préalablement audité par le comité d'éthique de la Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée. La totalité du protocole a été conduit en accord avec les recommandations de ce même comité d'éthique et en conformité avec les principes exposés dans les textes et guides de référence, notamment le Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (préparé par l'Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, et publié par National Academy Press, révisé en 1996).[81]

A l'entrée en protocole, les poids des agneaux étaient de 40 ± 4 kg.

Les études ont été réalisées sur 16 animaux randomisés en 3 groupes correspondant aux 3 différentes interventions prévues:

Groupe 1 (5 agneaux) : Cerclage classique de l'AP

Groupe 2 (5 agneaux +2 décédés en cours de protocole) :

Prélèvement musculaire

Cerclage classique de l'AP

Greffe cellulaire dans le VD

Groupe 3 (4 agneaux) : Cerclage de l'AP classique

Greffe d'un placebo dans le VD

Après deux mois de préparation ventriculaire droite, les quatorze agneaux ayant survécu ont subi une évaluation hémodynamique, puis les cœurs ont été prélevés pour analyse histologique.

II. Schéma expérimental

Les grandes phases de cette étude sont illustrées dans la *Figure 1*

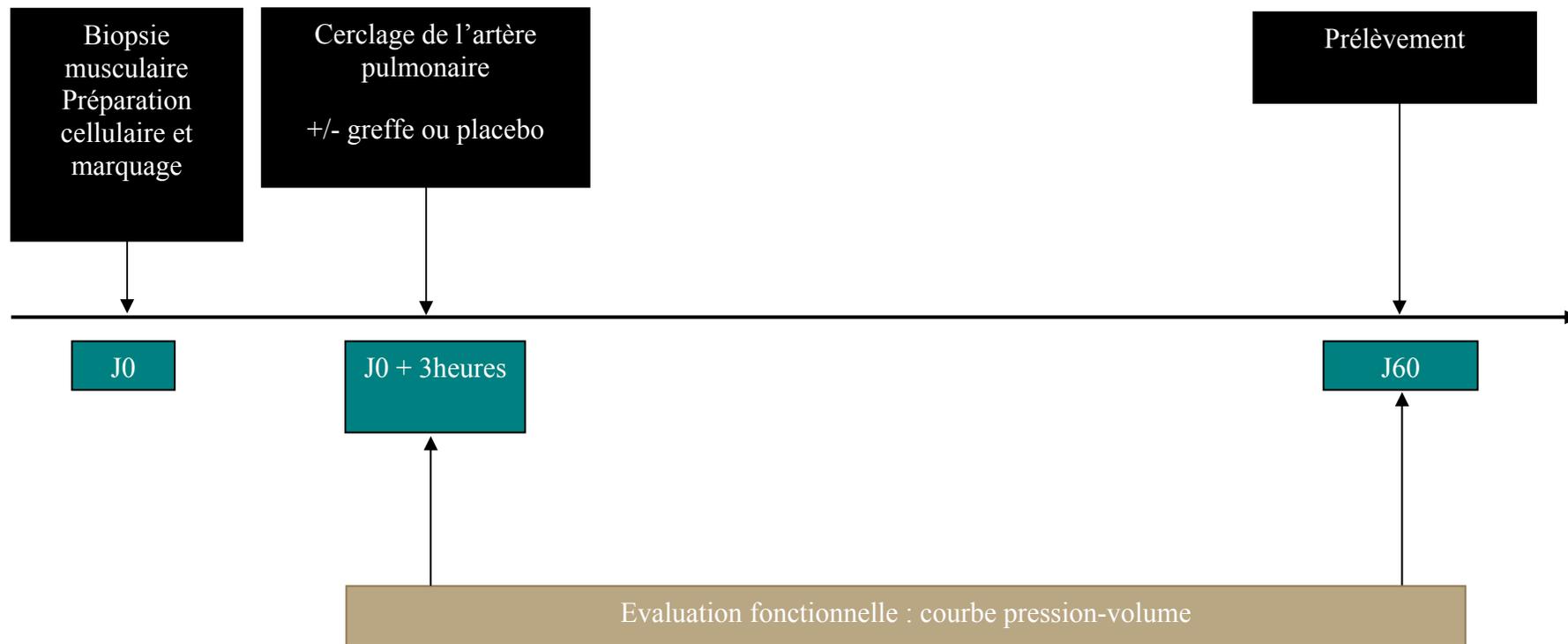


Figure 1: Schéma expérimental de l'étude « Apport de la cardiomyoplastie cellulaire à la préparation ventriculaire »

III. Culture cellulaire

A. Technique de culture

La technique de préparation cellulaire utilisée ici pour sélectionner les cellules satellites (myoblastes squelettiques) in vitro, a été développée au laboratoire de l'IMM recherche [12]. La biopsie musculaire a été réalisée dans le muscle biceps fémoral. Le principe est celui d'une dissociation mécanique, d'une digestion enzymatique puis d'une sélection des cellules d'intérêt par centrifugations différentielles.

B. Produits utilisés

Divers types de produits et de milieux ont été utilisés pour la technique de culture présentée ci-dessous. Leurs noms, leurs compositions et leurs abréviations sont les suivants :

1. DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM) avec Glutamax-1, sodium pyruvate, pyridoxine, 4500 mg/l glucose, GIBCOND
2. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH7, 2/0,1M, GIBCOND
3. Collagénase (dessicat) SIGMAND C-9891, Lot 129H8607 collagen digestion activity: 548U/mg solid; FALGPA hydrolysis activity: 1.9 U/mg solid
4. Trypsine (1X) , GIBCOND
5. Sérum de veau foetal (SVF), GIBCOND
6. Pénicilline/Streptomycine (Péni/strepto), GIBCOND

C. Milieux préparés par l'opérateur

Milieu de culture de base :

DMEM complété (DMEMc)

DMEM 79%

SVF 20%

Péni/strepto 1%

Pour la culture cellulaire (boîtes témoins pour valider la nature myoblastique des cellules implantées à J0), une observation quotidienne a été réalisée avec un microscope inversé à contraste de phase (LEICAND, DMIL).

D. Biopsie musculaire

Le prélèvement a porté sur 10 grammes de tissu musculaire pris sur la cuisse gauche (muscle biceps fémoral). La technique anesthésique utilisée a été la même que celle employée pour la deuxième intervention (cerclage de l'AP et/ou implantation intramyocardique) et est détaillée dans la partie « Anesthésie ».

Les agneaux du Groupe 2 ont été placés en décubitus latéral droit avec les membres postérieurs en extension. Le muscle biceps fémoral a été exposé par une incision cutanée en regard de ce muscle, sur la face latérale de la cuisse gauche. Après l'incision du fascia recouvrant cette région, un morceau de tissu musculaire (10 grammes environs) a été prélevé en utilisant le bistouri électrique. Le prélèvement a été nettoyé du fascia et du tissu conjonctif, puis haché avec des ciseaux par l'opérateur avant d'être stérilement transféré dans un milieu de culture: DULBECCO'S Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCOND), refroidi à 4°C. Les différents plans ont été fermés successivement de manière classique.

E. Dissociation mécanique

La biopsie a été transférée dans une cupule stérile puis coupée aux ciseaux de Mayo en petits dés. La dissociation mécanique a été poursuivie avec des ciseaux plus fins jusqu'à l'obtention d'un mélange type compote. Cette préparation a été stérilement transférée dans deux tubes contenant chacun 10 mL d'une solution stérile à base de collagénase 0,2% (voir préparation plus bas) puis a été pesée (environ 10 grammes).

F. Préparation des enzymes

Une solution de collagénase (SIGMAND C-9891, Lot 129H8607, collagen digestion activity: 548 U/mg solid; FALGPA hydrolysis activity: 1.9 U/mg solid) à 0,2 % a été préparée comme suit : 0,2g (/100mL) dans deux tubes de 50 mL avec 50 mL de DMEM par tube. Le mélange a été filtré avec une unité de filtration à dépression (ultrafiltration à 0.2µm).

G. Digestion enzymatique des fragments musculaires

Les tubes contenant les fragments musculaires ont été transférés dans un agitateur sec à 37°C pendant 20 min. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 200g (=1200 t/mn) pendant 2 min. Le surnageant contenant les cellules satellites (environ 5 mL de culot et 10 mL de surnageant) a été retiré et conservé dans un flacon de 75 cm³ contenant 50 mL de DMEM complété avec du sérum de veau fœtal et des antibiotiques (DMEMc). Dix mL de collagénase 0,2 % ont été rajoutés à chaque tube avec le culot restant puis remis à l'agitation à 37°C pendant 20 min encore. Cette série de digestions enzymatiques a été recommencée 4 fois, soit 5 extractions en tout.

H. Filtration et préparation finale

Le contenu du flacon de 75 cm³ avec les cellules satellites a été filtré avec des filtres autoclavés de 250 µm pour le retrait des plus gros éléments musculaires. La préparation a été ensuite lavée par centrifugation dans 4 tubes de 50 mL, à 2000 t/min pendant 15 min ; le surnageant a été éliminé. Cette étape a été répétée encore une fois.

L'ensemble a été reconditionné dans du DMEM pour la phase de marquage.

I. Marquage cellulaire

La technique de marquage cellulaire a été pratiquée comme suit :

Les cellules ont été lavées au PBS une fois dans 30 mL puis remises en suspension dans

10 mL de PBS. Le cmDiI a été ajouté (un tube de 50 µL, à 1 mg/mL dans du DMSO, dilution=1/200 (5×10^{-4} /mL)). Les cellules ont été laissées 5 min à température ambiante puis 15 minutes dans la glace. Vingt mL de PBS ont été ajoutés puis les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 2000 t/min. Les cellules ont enfin été lavées 3 fois puis reconditionnées dans 2 mL de DMEM pur pour être greffées.

Pour vérifier le nombre de cellules présentes dans la préparation cellulaire d'origine (et donc le nombre de cellules injectées), un échantillon de la préparation a également été sauvegardé avant marquage au cmDiI (utilisé ici pour le marquage *in vivo*) puis marqué au DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, marqueur fluorescent bleu de l'ADN (SigmaND) utilisé ici comme marqueur des noyaux *in vitro* uniquement). Les cellules ont été lavées au PBS une fois dans 30 mL puis remises en suspension dans 5 mL de DMEM pur. Le DAPI a été ajouté (25 µL/ 5mL) et laissé au contact des cellules pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont enfin été lavées 3 fois. Les cellules ont été ensuite reconditionnées puis comptées à la cellule de Malassez avec un microscope à immunofluorescence bleue (LEICAND, DMIL).

J. Observation de myotubes et immunomarquage

Deux boîtes de Pétri ont été systématiquementensemencées au moment de la greffe ; l'une d'entre-elles a été observée au maximum de confluence pour l'éventuelle formation de myotubes, structures multinuclées allongées et larges, précurseurs de la fibre musculaire, signant ainsi la nature myoblastique des cellules cultivées. La formation des myotubes a été favorisée par le non-renouvellement du milieu de culture classique DMEMc. L'autre boîte a été gardée pour un immuno-marquage avec le facteur de régulation musculaire MyoD (DAKOND), comme précédemment décrit.[77]

IV. Anesthésie

A. Prémédication

Juste avant l'induction, les agneaux ont reçu une prémédication avec une injection de midazolam (HYPNOVELND, 0,5 mg/kg IV) dans la veine jugulaire.

B. Induction

L'induction a été réalisée à l'aide d'étomidate (HYPNOMIDATEND, 0,5 mg/kg, IV) ; les animaux ont ensuite été intubés et placés sous oxygène pur.

Une sonde gastrique a été posée pour drainer le contenu de l'estomac.

C. Entretien

Les animaux ont été placés sous ventilation contrôlée (Veterinary Anesthesia Ventilator, HALLOWELL EMC Model 2000, volume courant : 15mL/kg/min, permettant d'atteindre une pression de 20 cm H₂O). Des apnées ont été faites pendant chaque acquisition des mesures hémodynamiques.

L'entretien de l'anesthésie a été obtenu avec 2% d'isoflurane dans 100% d'oxygène. L'antibioprophylaxie a été réalisée avec du céphamendole (KéfandoleND) 750 mg IV toutes les 2 heures.

Pendant toute la durée de l'intervention, les animaux ont été perfusés avec un soluté de Ringer Lactate (10mL/kg/h). Les agneaux ont également été placés sur tapis chauffant à circulation d'eau.

La surveillance comportait un ECG et les mesures suivantes : pression artérielle invasive (cathéter posé à l'oreille), capnométrie, température corporelle (sonde œsophagienne).

Des valeurs seuil étaient fixées : fréquence cardiaque entre 60 et 120 bpm, pression artérielle moyenne entre 60 et 90 mm Hg, pression partielle en CO₂ entre 35 et 45 mmHg.

Au moment de la fermeture du thorax par le chirurgien, un bloc de bupivacaïne 0,5% a également été réalisé sur les espaces intercostaux intéressés par la thoracotomie (4 mL à chaque injection, trois sites intercostaux en tout).

V. Soins postopératoires

Les cathéters veineux et artériels ont été retirés avant le réveil des animaux. De la

morphine (Morphine base ND) a été administrée au moment du réveil (0,2 mg/kg IV). Une injection de kétoprofène (Ketofen ND), à la dose de 2 mg/kg IM, a été faite pendant le réveil de l'animal. Les animaux ont également reçu une injection de dexaméthasone (Dexafort, 0,1mg/kg IM) au réveil puis tous les trois jours, soit trois fois en tout. L'antibioprophylaxie avec du céphamendole (20mg/kg IV par jour) a été poursuivie avec une injection d'amoxicilline longue action (10mg/kg, IM), une fois tous les deux jours, trois fois en tout.

VI. Evaluation hémodynamique avant et après l'entraînement

La technique utilisée au cours de l'étude a été d'acquérir des valeurs de pression et de volume pour établir des courbes pression-volume. A partir de ces courbes, il a été démontré [19] que des facteurs relativement indépendants des conditions de charges pouvaient être calculés pour mesurer la contractilité cardiaque. Les pressions ont été acquises par un cathéter dont le micro-transducteur se trouve directement dans la cavité ventriculaire (cathéter d'ultra précision de Millar ND). Le volume a été également mesuré par ce même cathéter (dit de conductance), fonctionnant sur la mesure de la résistivité du sang, dont des volumes segmentaires du ventricule peuvent être déduits.

A. Technique d'évaluation

L'application du cathéter de conductance a été largement publiée et validée pour le ventricule gauche [5, 7]. Plus récemment, cette même méthode a été utilisée avec succès pour mesurer le volume du ventricule droit [25, 106, 108]. Brièvement, le signal de conductance a été acquis en trois segments parallèles dans le VD. Tous les signaux instantanés de pression et volume étaient acquis puis transformés en une boucle de pression-volume à l'aide du logiciel IOX 1.6.17.7 d'EMKA Technologies. La technique d'évaluation de la fonction ventriculaire reposait sur l'acquisition de courbes pression-volume de la cavité droite, en condition hémodynamique normale. De ces valeurs amplifiées et calibrées ont été mesurés les paramètres hémodynamiques suivants : dPdt_{max} et min, pression développée, travail d'éjection, PRSW (preload recruitable stroke work).

Les mesures des performances contractiles du VD consistaient en deux parties : état mécanique stable et occlusion.

1. Etat mécanique stable

L'acquisition a eu lieu pendant une période sans influence mécanique ou chimique.

Quatre paramètres ont été mesurés :

Pression développée : la différence entre les pressions systolique et diastolique ;

dP/dt Max et dP/dt Min: le maximum et le minimum de la première dérivée de la pression en fonction du temps[79, 111];

Stroke work : Travail d'éjection produit par le ventricule à chaque cycle cardiaque, soit l'aire déterminée par la courbe pression-volume à chaque battement [93].

2. Etat d'occlusion

Pour obtenir différentes courbes pression-volume du VD, et ainsi pouvoir déterminer les valeurs d'intérêt sous différentes conditions de charge, les signaux de pression et de volume ont été enregistrés pendant un gonflement progressif d'un ballonnet dans la veine cave caudale. Pendant cette diminution, la relation entre le travail d'éjection et le volume télé-diastolique (PRSW Preload recruitable stroke work) a été enregistrée [93].

B. Méthode du cathéter de conductance

1. Introduction des principes

La technique de cathéter de conductance est fondée sur les mesures de la conductance électrique instantanée-variable du sang dans le ventricule. La conductance électrique est linéairement proportionnelle au volume réel du sang dans le ventricule (loi d'Ohm). Le ventricule est divisé précisément en plusieurs segments. La conductance de chaque segment est obtenue par la mesure du voltage entre deux électrodes consécutives du cathéter de conductance (voir *Figure 2*).

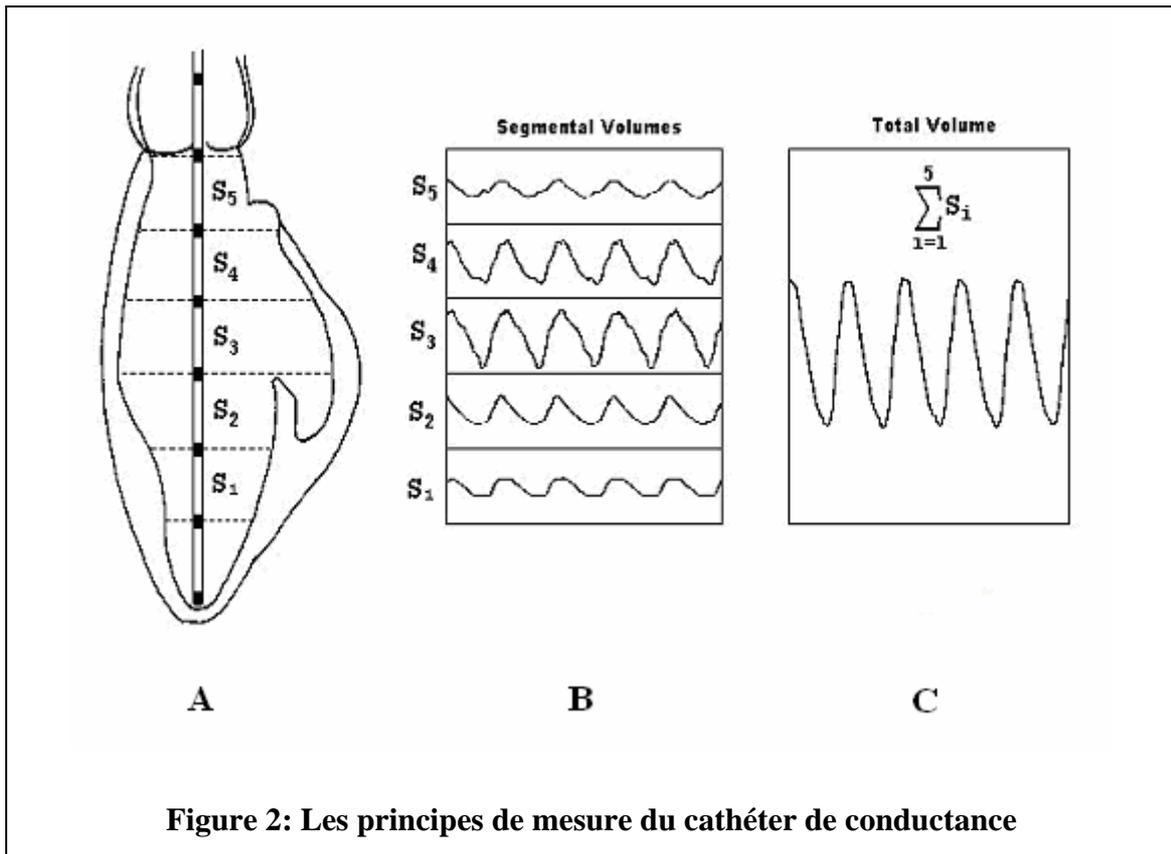


Figure 2: Les principes de mesure du cathéter de conductance

A : Les segments du cathéter de conductance dans le ventricule

B : Les signaux des volumes segmentaires

C : Le signal du volume total

Les volumes segmentaires présentent une relation avec les conductances segmentaires mesurées en utilisant l'équation 1:

$$V_i(t) = L^2 \cdot \rho \cdot G_i(t)$$

Équation 1

$V_i(t)$ = volume segmentaire instantané-variable

L = distance inter-électrode

ρ = résistivité du sang

$G_i(t)$ = conductance segmentaire instantanée-variable mesurée

Le volume total du ventricule est défini comme l'addition des volumes segmentaires comme décrit par l'équation 2 :

$$V(t) = L^2 \cdot \rho \cdot \sum_{i=1}^n G_i(t)$$

Équation 2

Mais, il existe deux phénomènes qui rendent le calcul du volume ventriculaire plus compliqué que celui de l'équation 2:

Le cathéter de conductance mesure non seulement la conductance du sang dans le ventricule, mais aussi détecte la conductance du myocarde environnant, conductance dite parallèle (G_p). La conductance parallèle doit donc être déterminée pour obtenir un volume de correction (V_c), qu'il est nécessaire de soustraire au volume total mesuré pour obtenir le volume intra-ventriculaire absolu[15].

Il existe également un facteur de pente nécessaire à la calibration : le facteur alpha (α).

L'introduction de ces deux facteurs de calibration se présente selon la relation suivante:

$$V(t) = \frac{1}{\alpha} \left(L^2 \cdot \rho \cdot \sum_{i=1}^n G_i(t) - V_c \right)$$

Équation 3

2. Détermination des facteurs

a) Facteur α

Le facteur α peut être déterminé par comparaison entre une mesure de débit ou de volume par une technique de référence (par exemple, mesure du débit par thermodilution) et par la technique du cathéter de conductance.

Le facteur α est donné par l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{\text{débit - Conductance}}{\text{débit - Thermodilution}}$$

Équation 4

b) Volume de conductance parallèle (V_c)

La méthode la plus souvent utilisée pour déterminer le Vc est la technique de dilution. Elle est de fait une analyse du signal de conductance pendant un changement momentané et provoqué de la conductivité du sang. Pour les mesures dans le VD, une injection rapide de sérum salé hypertonique 10% dans la veine cave permet un bon mélange avec le sang avant son entrée dans le ventricule. Lorsque ce mélange entre temporairement dans le ventricule, un changement progressif du signal de conductance est observé (voir *Figure 3*). L'augmentation du signal de conductance (ou volume) peut être extrapolée en télésystole et télédiastole pour obtenir un volume intraventriculaire théoriquement nul (volume télésystolique=volume télédiastolique). La valeur du volume total est alors celle de la conductance et du volume parallèle.

Ainsi, la conductance parallèle est calculée puis enregistrée dans l'ordinateur pour réaliser la calibration des mesures.

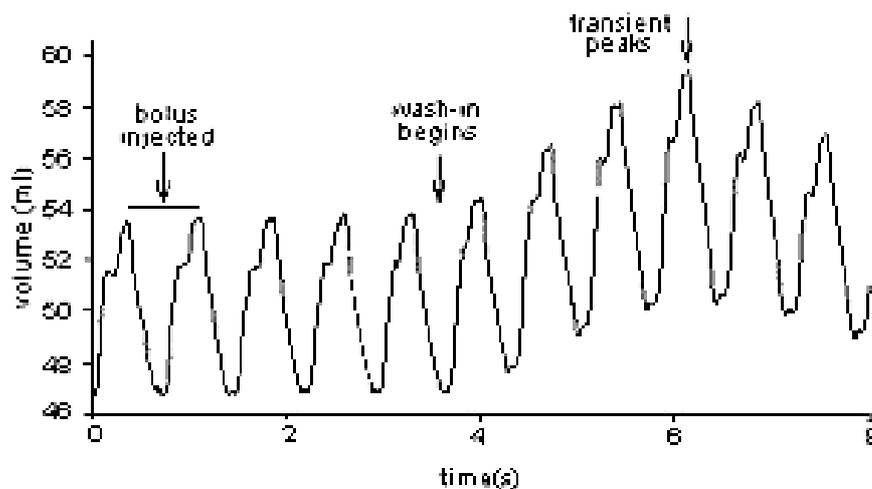


Figure 3: Modification du signal de volume lors d'une injection de sérum salé hypertonique

C. Voie d'abord

L'animal a été placé en décubitus dorsal. Une tonte large et une préparation chirurgicale classique du cou et des creux inguinaux ont été effectuées avant de draper l'animal stérilement. Après une héparinisation de l'animal (0,5 mg/kg IV), deux introducteurs

ont été posés de manière percutanée: l'un de 7 Fr dans la veine fémorale droite (CORDISND), l'autre de 10 Fr dans la veine jugulaire droite (CORDISND).

D. Matériel utilisé

Toute la manipulation a été réalisée sous amplificateur de brillance (Sténoscope, General Electric, Milwaukee, USA).

Après calibration en pression et en volume, une sonde de Millar pression-volume (HOUSTON, USA - 6 Fr, 120 cm avec extrémité en queue de cochon, 10 électrodes, espacement de 7 mm, référence : 815-0039-1, model SPC-560) a été introduite par l'introducteur de 7 Fr (veine fémorale droite) jusqu'au ventricule droit. Cette sonde était connectée à un processeur Leycom Sigma-50F (Cardiodynamics, Zoetermeer, Pays-Bas). Les signaux de pression et de volume étaient traités par le logiciel IOX 1.6.17.7 d'EMKA Technologies, installé sur un PC CompaqND Pentium I avec Windows NT.

Le cathéter de thermodilution de Swan Ganz [26] (BAXTERND 7,5F, 110 cm, référence : 831HF75) a été introduit par l'introducteur de 10 Fr jusqu'à l'artère pulmonaire. Il a été connecté à un moniteur Hewlett Packard (78354A) avec module de débit[72]. (voir *Figure 4*-position des cathéters dans VD)

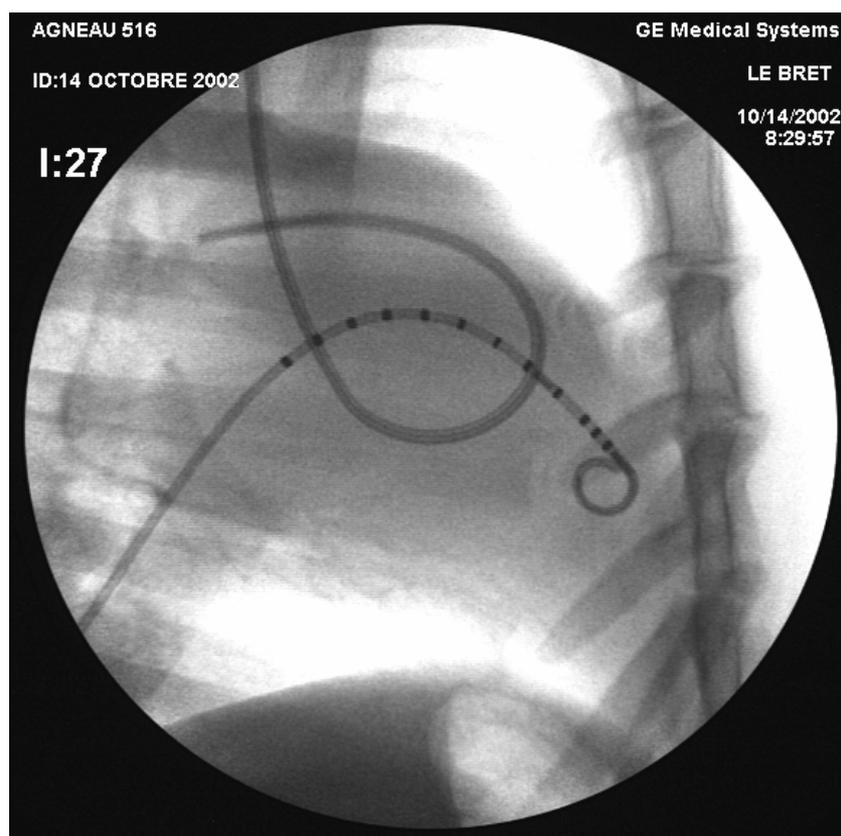


Figure 4 : Position du cathéter Millar et du cathéter Swann-Ganz dans le VD

E. Protocole d'acquisition

Avant l'introduction des cathéters, une calibration à l'air de la sonde de Millar a été réalisée pour la pression et pour le volume.

Tous les animaux ont été évalués lorsque les paramètres de monitoring peropératoire étaient stabilisés, en particulier la pression partielle en CO₂ entre 35 et 40 mmHg, la pression artérielle moyenne 60 et 90 mmHg et le pourcentage d'isoflurane (mesurés par analyseur de gaz halogéné) entre 1,5 et 2,5%. Toutes les acquisitions hémodynamiques ont été obtenues pendant une apnée en fin d'expiration.

Le débit cardiaque de référence pour mesurer le paramètre alpha a été acquis de manière classique avec le cathéter de thermodilution de Swann-Ganz. Trois mesures répétées à 3 minutes d'intervalle ont servi à ce calcul. Puis la sonde de Swan-Ganz a été retirée dans l'oreillette droite pour injecter le sérum salé hypertonique 7,5% (2 fois 10mL à 3 minutes d'intervalle). Les modifications de la résistivité, donc du volume perçu par la sonde, étaient vérifiées en temps réel sur l'écran de l'ordinateur. La sonde de Swan

Ganz a été ensuite retirée de l'introducteur placé en jugulaire et un cathéter à ballonnet de 18 mm (CORDISND) a été placé dans la veine cave caudale. Une série de trois occlusions a été réalisée en gonflant le ballon à 3 minutes d'intervalle. Les variations caractéristiques de la courbe pression-volume étaient vérifiées sur l'écran de l'ordinateur. Cette technique a été appliquée pour les deux évaluations, à J0 (avant le cerclage) et à J60 (avant le sacrifice et prélèvement du cœur pour étude histologique). Les gestes chirurgicaux n'ont été démarrés qu'après une période de 30 minutes suivant l'évaluation hémodynamique du VD.

F. Technique chirurgicale

1. Voie d'abord

Une tonte large de toute la face latérale du thorax a été effectuée. L'animal était placé en décubitus latéral droit. Un billot a été placé sous le thorax. L'abord chirurgical s'est fait par thoracotomie intercostale gauche par le 4^{ème} espace intercostal. Les muscles cutanés du tronc, grand dorsal, dentelé, scalènes et intercostaux ont été incisés dans le sens des côtes. Une fois la cavité pleurale pénétrée, un écarteur autostatique de Finochietto a été introduit dans le 4^{ème} espace intercostal. Le péricarde a été ouvert sur toute sa longueur, le long du grand axe cardiaque et mis en tension par des fils de traction reliés au champ opératoire.

2. Cerclage de l'AP

Le tronc de l'AP a été disséqué de la racine de l'aorte avec des ciseaux fins, puis un petit dissecteur a été utilisé pour la mise en place d'un lac sans serrage autour de l'AP. Un cathéter 22G a été introduit à la base de l'artère pulmonaire (proximalement au lac bleu). La pression systolique proximalement au site de cerclage a alors été notée (pression de base); cette même mesure a été réalisée lors de clampage complet de courte durée de l'artère pulmonaire avec un clamp vasculaire (pression maximale). Le cerclage était ensuite serré (puis suturé avec un fils de ProlèneND 5-0) pour atteindre la

pression moyenne ((pression de base + pression maximale) / 2).

3. Préparation des cellules pour l'implantation myocardique

Les cellules ont été conditionnées dans un tube de 10 mL de DMEM. Le temps maximal entre le conditionnement des cellules et leur implantation était de 10 minutes. Une homogénéisation du contenu cellulaire a été pratiquée avant l'implantation cellulaire.

4. Dispositif d'injection

Une seringue à insuline (1 mL) a été connectée à une aiguille épicrotânienne de 27G (VYGONND). Les ailettes de l'aiguille étaient maintenues dans une pince de Halstedt. Le fourreau de l'aiguille a été taillé à façon pour servir de garde et ne laisser dépasser qu'une petite partie de l'aiguille; ce dispositif simple a assuré ainsi une injection intramyocardique. Les longueurs d'aiguilles ont été fixées à 2 mm.

5. Injections intramyocardiques

Vingt injections sur le ventricule droit ont été pratiquées sur les deux premiers animaux puis 10 sur les 5 autres du groupe 2 et les 4 du groupe 3.

Une zone d'injection a été repérée par trois points de suture épicrotâniens en triangle avec un fil de polypropylène 6-0 (ProlèneND) pour faciliter les prélèvements prévus le jour de l'autopsie.

Un contrôle de l'ECG était effectué au moment de chaque pénétration de l'aiguille et pendant les injections.

6. Fermeture du thorax

Le péricarde a été refermé partiellement par un surjet de polyglactine 910 (VICRYLND) décimale 3. Après la mise en place d'un drain thoracique (30 Ch) à aspiration continue, la paroi costale a été fermée de manière classique plan par plan. Du fil de polyglactine

910 (VICRYLND) décimale 4 a été utilisé pour rapprocher les côtes et suturer les différents plans musculaires par des surjets interrompus ; ce même fil en décimale 3 a été utilisé pour le surjet sous-cutané ; puis un surjet continu avec un fil de polyamide (ETHILONND) décimale 2 a été réalisé sur le plan cutané.

VII. Autopsie, analyse histologique et immunohistochimique

Après l'évaluation à J60, les agneaux ont été sacrifiés. L'euthanasie a été pratiquée par l'injection intraveineuse de pentobarbital (DoléthalND). Les cœurs ont été prélevés par la même voie d'abord intercostale.

La partie sténosée de l'AP a été prélevée en gardant le lac. Après la résection des gros troncs (jusqu'aux valves sigmoïdes) et des oreillettes gauche et droite, le reste du cœur a été pesé. Puis la paroi libre du VD a été disséquée du cœur et pesée.

Le VD a ensuite été prélevé en différents endroits : zones greffées et zones non-greffées respectivement.

Chaque prélèvement a été divisé en deux éléments. Le premier a été fixé dans du formol dilué au 1/10^{ème} (formol 3%) pour la microscopie optique et l'immunohistochimie, le deuxième a été congelé à -80°C avant d'être coupé au cryostat (-20°C) pour la fluorescence.

Sur les coupes en paraffine de 7µm pour la microscopie optique, après une inclusion en paraffine classique, un marquage HE standard et une révélation par une technique immunohistochimique de la chaîne lourde de myosine squelettique au 1/100^{ème} (clone MY32, SigmaND) a été appliquée par une technique automatisée pour rechercher les signes de myogenèse dans les sites de greffe.

Le principe de révélation immuno-histochimique sur banc automatisé est le suivant :

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées avec du PBS puis incubées 30 min avec les anticorps primaires (MY32). Après un rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 8 min avec un anticorps anti-IgG de souris biotinylé. Après un rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubées pendant 8 min avec de la streptavidine couplée à de la peroxydase. Après un rinçage dans du PBS les coupes ont été incubées pendant 8 min avec les substrats de la peroxydase (eau oxygénée et diamino-benzidine) jusqu'à obtention d'un produit de réaction coloré en marron. Puis elles ont enfin été contre-colorées avec de l'hématoxyline et post-contre colorées avec un réactif bleu, puis

rincées et montées sur lamelles.

Les coupes faites au cryostat pour évaluer la présence des marqueurs fluorescents ont été réalisées à -20°C . L'épaisseur des coupes était de $10\mu\text{m}$. Les lames ont été gardées vierges et ont été observées avec un microscope à immunofluorescence (LEICAND, DMIL).

VIII. Etude des animaux décédés

Deux animaux sont décédés au cours du protocole et ont été autopsiés. Les cœurs ont été également prélevés puis ont subi les mêmes traitements que pour les autres animaux.

IX. Gestion statistique des données

Les paramètres étudiés ont été recueillis et exprimés en valeur moyenne +/- écart-type. Les comparaisons des paramètres entre les groupes (groupe 1 avec groupe 2 et groupe 2 avec groupe 3) et entre les dates (avant et après la préparation ventriculaire) ont été effectuées au moyen d'un test non paramétrique (test de Mann-Whitney). Le seuil de significativité d'une différence pour un paramètre donné était de 5%. Le logiciel utilisé était SPSS for Windows (Release 11.0.0).

RESULTATS

I. Evolution clinique des agneaux au cours de l'étude

Deux agneaux sont morts au cours de l'étude à J7 et J10 respectivement. Ces deux agneaux étaient les deux premiers greffés avec des cellules. Leur état clinique s'est dégradé 4 à 5 jours après la greffe et a évolué vers une insuffisance cardiaque droite majeure. Ces deux animaux ont été autopsiés après mort subite. L'autopsie a révélé chez ces deux animaux la présence d'un épanchement pleuro-péricardique, d'une péricardite et d'une myocardite oedémateuse exsudative. Ces résultats macroscopiques ont été confirmés en histologie. Ces deux premiers greffés avaient reçu 20 injections de 100µL chacune dans le VD. Suite à ces deux décès, les autres animaux n'ont reçu que 10 injections de 100µL réparties dans le VD ; en outre, le péricarde qui avait été partiellement refermé a été laissé plus ouvert. Les animaux suivants n'ont plus présenté ces complications majeures postopératoires.

Un agneau a développé un abcès de paroi 10 jours après la thoracotomie. Cet animal avait reçu des cellules. Il a reçu des soins locaux stériles quotidiens puis tous les 3 jours pendant 3 semaines, jusqu'à cicatrisation par 2^{ème} intention.

Tous les animaux ont stagné en poids. (voir *Tableau 1*) Cette observation peut étonner pour des animaux en croissance dont le gain moyen théorique est de 5 kg/mois en moyenne à cette période de la vie, mais est assez habituelle chez les ovins utilisés dans des modèles d'insuffisance cardiaque ou valvulaire.

Tableau 1 : Poids moyens des agneaux des trois groupes avant et 2 mois après cerclage + ou – injection de cellules ou placebo

GROUPE 1	Poids	MOYENNE
	Poids Avant (kg)	39.2
	Poids Après (kg)	39.2
	Poids Gagné (kg)	0.0
GROUPE 2	Poids	MOYENNE
	Poids Avant (kg)	39.7
	Poids Après (kg)	41.7
	Poids Gagné (kg)	2.0
GROUPE 3	Poids	MOYENNE
	Poids Avant (kg)	40.5
	Poids Après (kg)	42.0
	Poids Gagné (kg)	1.5

II. Préparation cellulaire sans culture

A. Comptage cellulaire

La méthode de comptage cellulaire ex vivo avec du DAPI a permis de déterminer un nombre moyen de cellules injectées : $1,7 \times 10^7$ cellules par animal.

B. Richesse en myoblastes des cultures témoins

1. Observation de myotubes

De nombreux myotubes ont été observés dans toutes les boîtes de culture, signant ainsi la nature myoblastique d'au moins une partie des cellules cultivées.

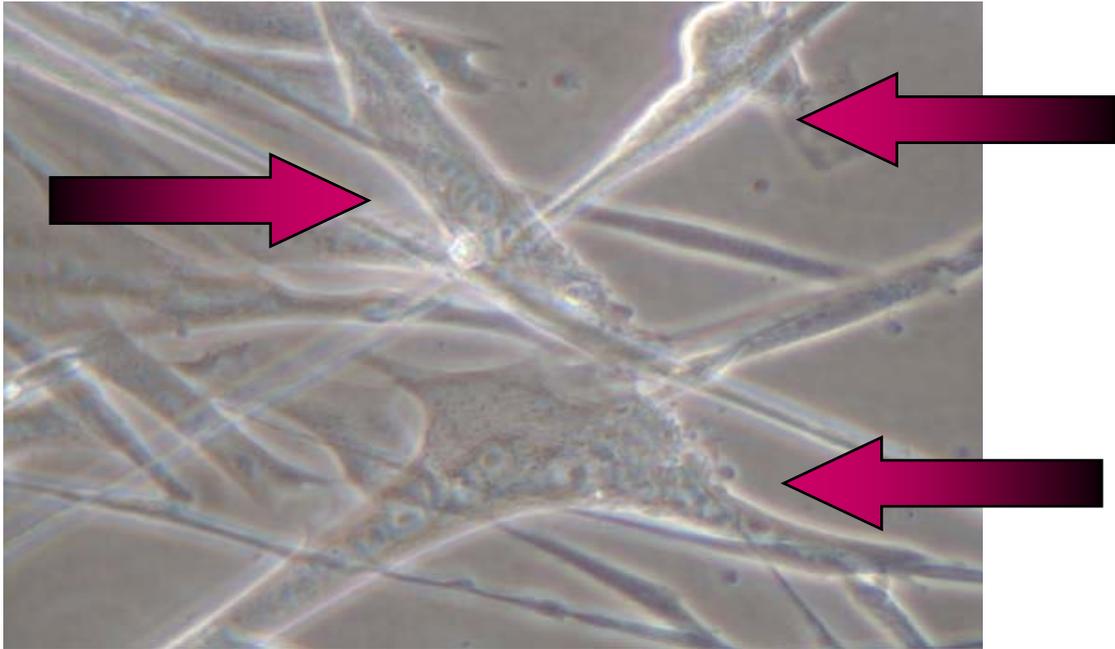


Figure 5: Observation de myotubes dans les cultures témoins (x400)

2. Méthode immunocytochimique

La quantification de la richesse myoblastique des cultures témoins en sous-confluence, par immuno-marquage révélant MyoD, a permis d'obtenir des taux de myoblastes de l'ordre de 50% (voir Figure 6). Les autres cellules adhérentes ont été considérées majoritairement comme des fibroblastes.

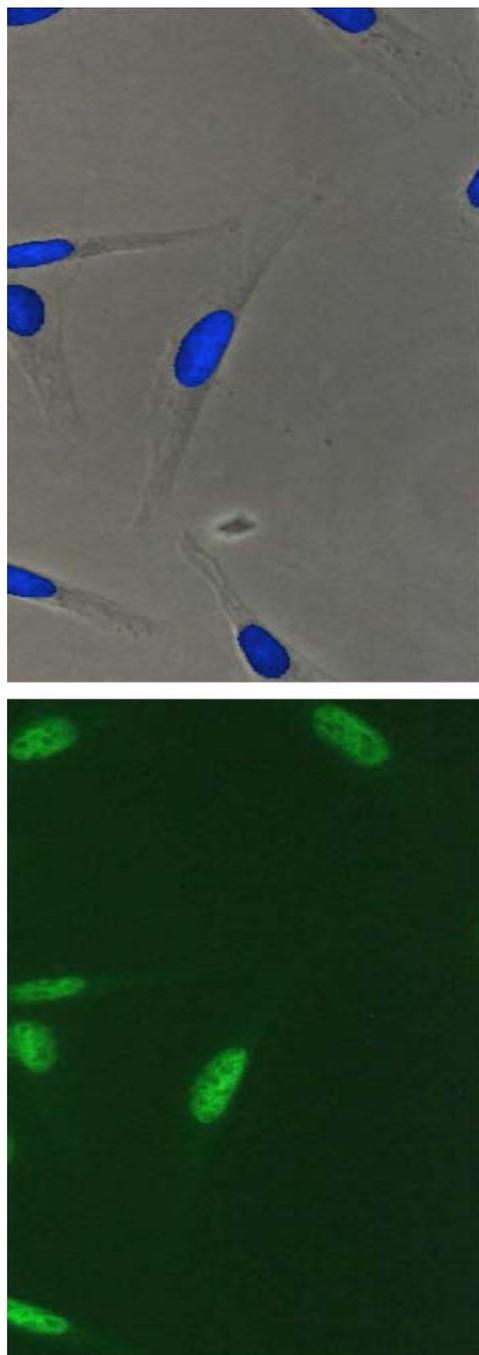


Figure 6: Caractérisation avec MyoD d'une culture témoin (panneau inférieur, noyaux en vert). Le panneau supérieur est une superposition d'une acquisition en contraste de phase et du marquage DAPI (noyaux en bleu), permettant d'individualiser tous les noyaux.

C. Marquage membranaire avec le cmDiI

Le cmDiI utilisé dans cette étude a déjà été validé dans la littérature et dans le laboratoire de l'IMM recherche[33]. Nous avons effectivement choisi ce type de marquage après avoir réalisé des études de marquage testant la durabilité et l'absence de marquage collatéral du tissu résidant lors de mort des cellules implantées. On a pu observer *in vitro* au cours de ces expériences préliminaires que 90% des cellules marquées au cmDiI étaient encore marquées après 5 divisions et que ces cellules tuées ne marquaient quasiment pas une population cellulaire sans marquage, après 2 heures et 48 heures de contact.

Les cellules cultivées dans nos boîtes témoins arrivées en sous-confluence conservaient effectivement leur marquage.

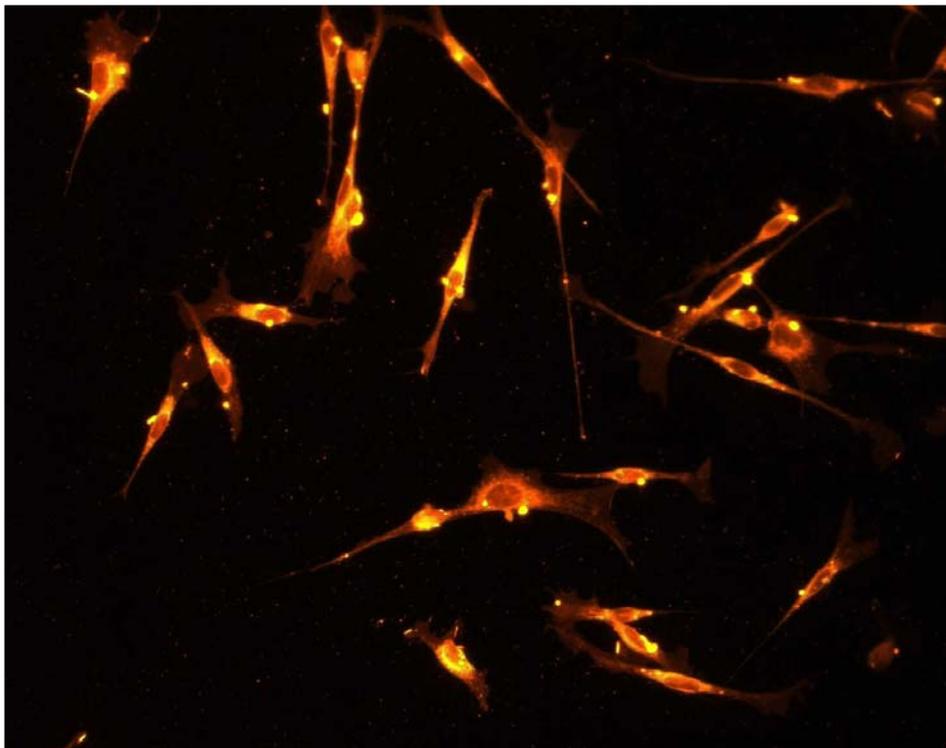


Figure 7: Marquage fluorescent des membranes avec le cmDiI dans une culture témoin (x400)

III. Evaluation fonctionnelle

A. Réalisation de l'examen hémodynamique / acquisition des courbes pression-volume

Seize animaux ont été explorés à J0 et 14 animaux à J0+2 mois (deux animaux étant morts à J7 et J10, respectivement). Ainsi, 30 examens d'environ 45 minutes chacun ont été réalisés pour l'acquisition des courbes pression-volume. Ils ont été poursuivis par un post-traitement d'environ une heure par examen pour calibrer et sélectionner les courbes d'intérêt.

Les courbes pression-volume acquises sont apparues en accord avec l'aspect caractéristique de ces courbes dans le ventricule droit (légèrement triangulaire, pointe vers le haut – voir *Figure 8*). La seule difficulté de l'examen a été de trouver une position adéquate pour le cathéter de conductance. Effectivement, trop enfoncée, le cathéter appuie sur la paroi ventriculaire et engendre des troubles du rythme ; trop en retrait, un nombre insuffisant de segments de volume sont acquis. Le logiciel IOX nous a permis de sélectionner les courbes correspondant aux segments situés dans le ventricule et d'exclure les courbes correspondant aux segments situés dans l'oreillette. Ainsi, 3 courbes ont été retenues pour notre examen (voir *Figure 9*) et c'est sur cette base que la calibration par rapport au débit de référence (mesuré par thermodilution) a été faite. Les occlusions de la veine cave caudale ont été réalisées avec succès par gonflement du cathéter à ballonnet. L'occlusion n'avait pas besoin d'être importante (approximativement 50% d'occlusion pendant 5 secondes) pour obtenir les modifications de courbes désirées (voir *Figure 10*).

Un examen à J0 a été totalement perdu suite à un incident informatique. Une des courbes de volume s'est décalé dans le temps. Les ingénieurs d'EMKA Technologies (ayant développé IOX) n'ont pas réussi à réparer cette erreur logicielle.

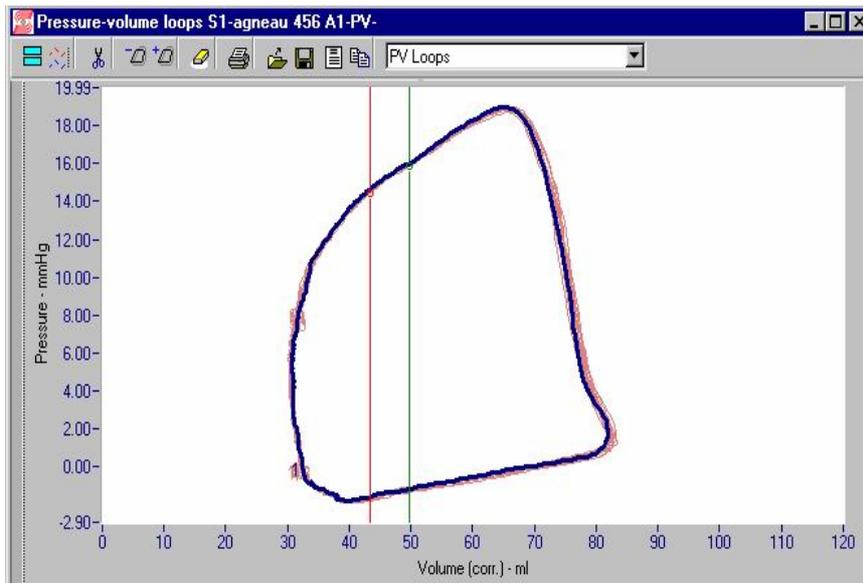


Figure 8: Courbes pression-volume (superposées) chez un animal à J0. Noter l'aspect pointu caractéristique de ce genre de courbe dans le ventricule droit

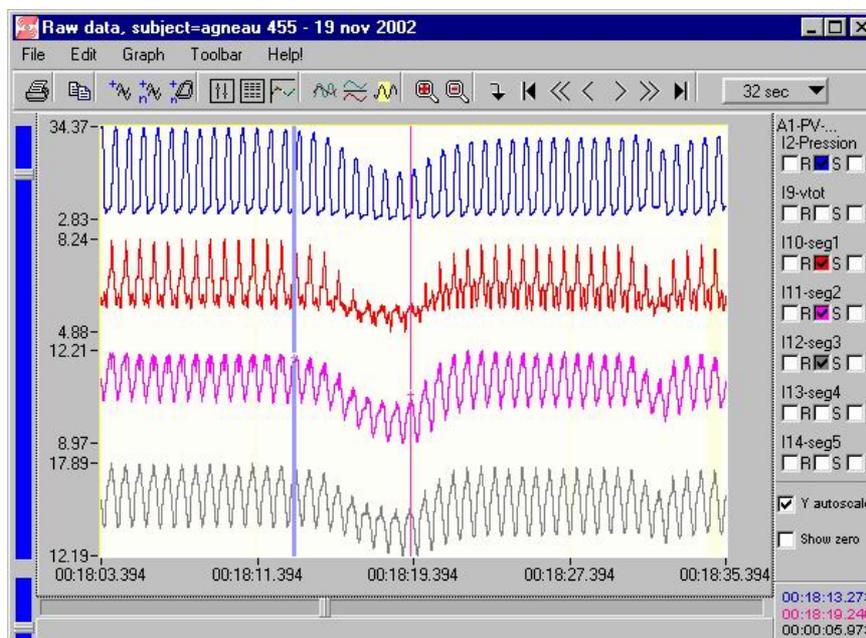


Figure 9: Vision linéaire d'une courbe de pression (bleue) et de 3 courbes de volume (rouge, rose et grise) au moment d'une occlusion

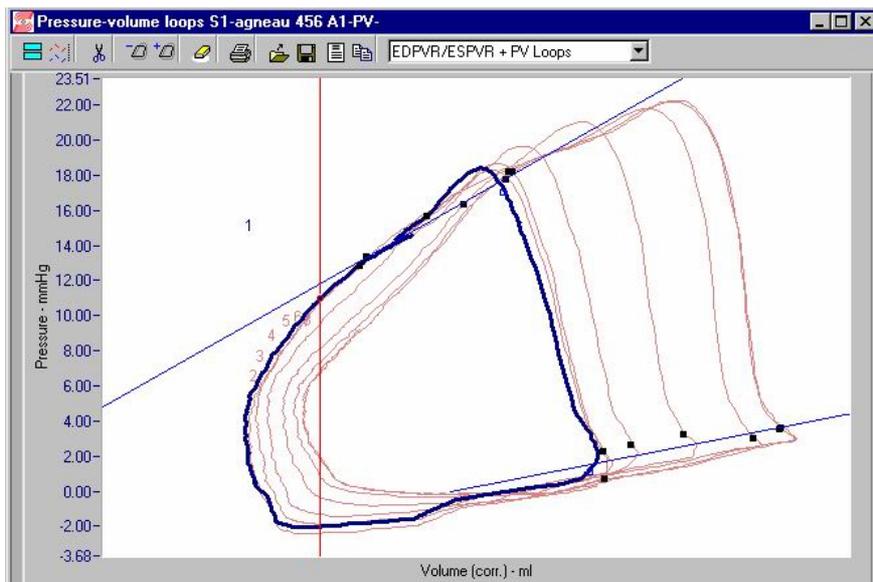


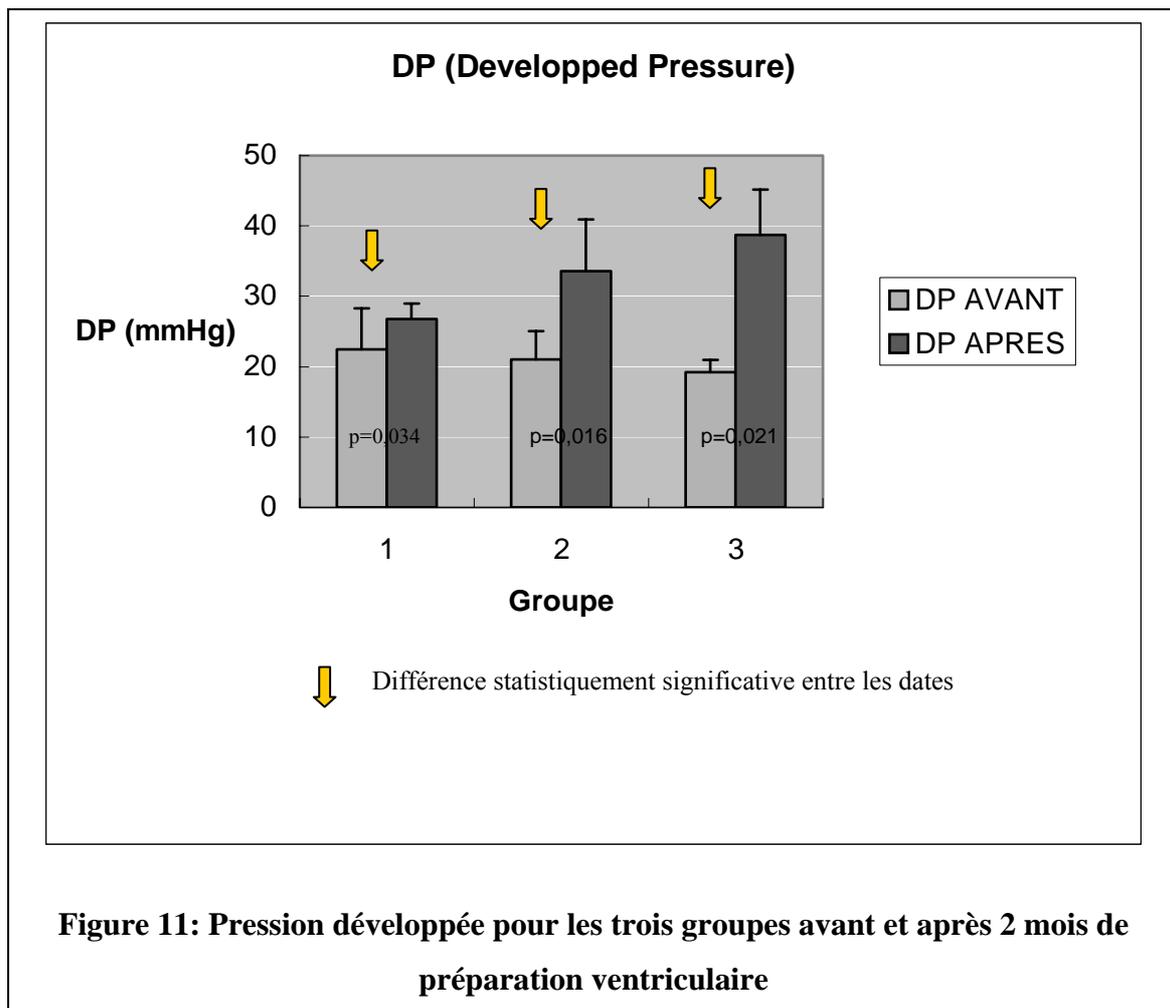
Figure 10: Courbes pression-volume (superposées au moment d'une occlusion) chez un animal à J0. Noter le déplacement vers la gauche et vers le bas lors de l'occlusion.

B. Résultats

Les résultats obtenus pour l'étude hémodynamique des trois groupes sont résumés dans les Figure 11, Figure 12, Figure 13, Figure 14 et Figure 15. Après l'observation des moyennes et des écart-types des cinq paramètres, un test non-paramétrique (Mann et Whitney) a été réalisé à cause d'une distribution anormale. Ce test a comparé les paramètres entre les groupes (groupe 1 avec groupe 2 et groupe 2 avec groupe 3) ainsi qu'entre les deux dates (avant et après la préparation ventriculaire).

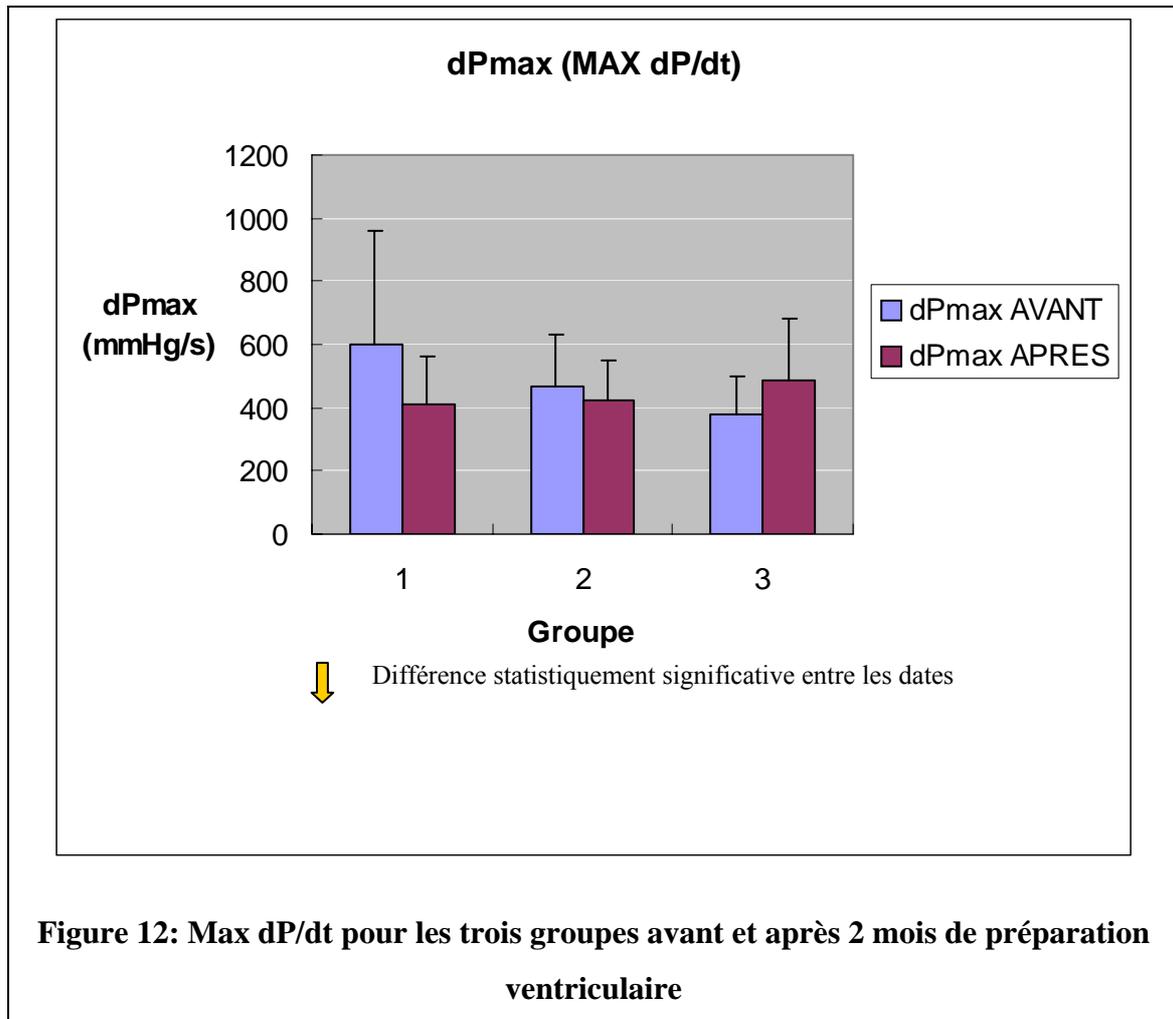
1. Pression développée (DP developed pressure)

Une différence statistiquement significative de pression développée a été observée avant et après préparation pour les trois groupes. Il n'y avait cependant pas de différence statistiquement significative entre les groupes.



2. dP maximale (Max dP/dt)

Aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée pour ce paramètre.



3. dP minimale (Min dP/dt)

Comme pour la pression développée, une différence statistiquement significative de dPmin a été observée avant et après préparation pour les trois groupes. Il n'y avait cependant pas de différence statistiquement significative entre les groupes.

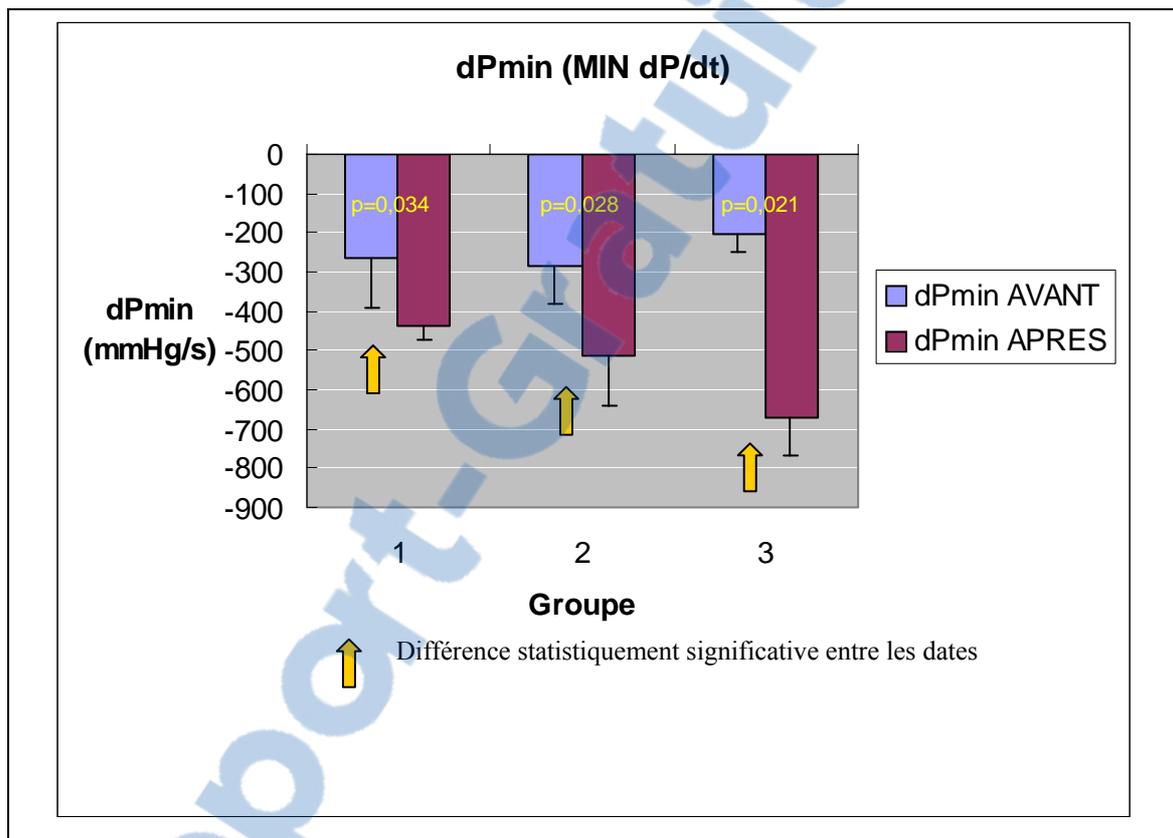


Figure 13: Min dPdt pour les trois groupes avant et après 2 mois de préparation ventriculaire

4. travail d'éjection (SW stroke work)

Seulement dans le groupe 3 (cerclage+placebo), une différence statistiquement significative de SW a été retrouvée entre les deux dates. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les groupes.

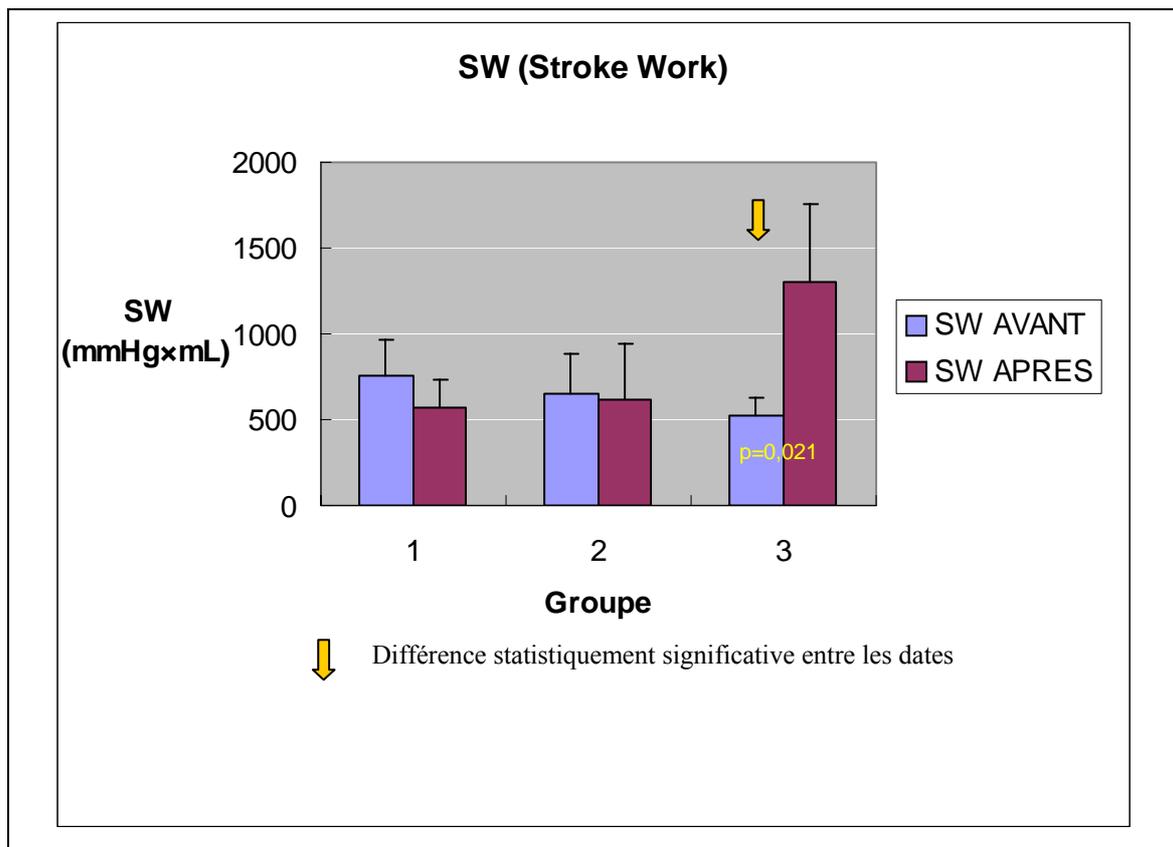


Figure 14: Stroke work (travail d'éjection) pour les trois groupes avant et après 2 mois de préparation ventriculaire

5. pente de PRSW (S-PRSW Preload Recrutable Stroke Work Slope)

La pente de la PRSW a augmenté dans les trois groupes avant et après la préparation ventriculaire. Ce résultat est aussi statistiquement significatif pour tous les groupes. Il n'y avait cependant pas de différence statistiquement significative entre les groupes.

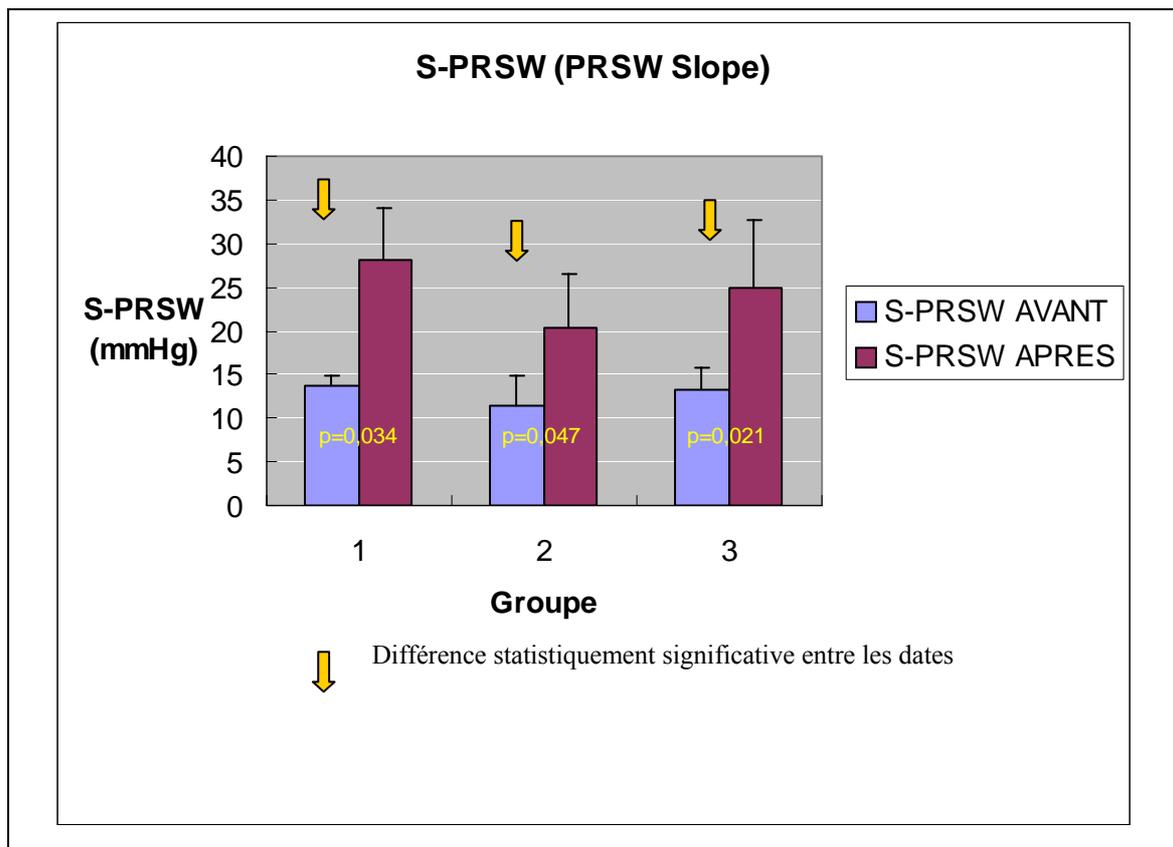


Figure 15: Pente de la PRSW (preload recruitable stroke work) pour les trois groupes avant et après 2 mois de préparation ventriculaire

IV. Anatomicopathologie

A. Observations macroscopiques

Les cœurs ont été prélevés puis disséqués et pesés. Les adhérences de poumons ou de péricarde se type fibreuses sur le VD étaient de petite taille et en faible nombre pour le groupe 1 (groupe témoin sans injection) et de taille importante ainsi qu'en grand nombre pour les deux groupes avec implantation cellulaire ou placebo. Le tableau 2 donne les résultats de cette première phase.

Tableau 2 : Moyennes des critères des cœurs des 3 groupes au prélèvement

MOYENNES DES CRITERES	GROUPE 1	GROUPE 2	GROUPE 3
Poids cœur(g)	141.9	152.0	158.0
Poids VD(g)	47.2	50.8	48.0
Poids VG(g)	94.7	101.3	110.0
Rapport VD/cœur	0.3	0.3	0.3
Epaisseur VD (mm)	5.9	5.0	5.3
Diamètre int. AP sténosée (mm)	8.4	10.0	8.0

B. Analyse histologique

Le devenir de ces cellules a été suivi par caractérisation du muscle squelettique développé sur le site de greffe (révélé par la chaîne lourde de la myosine squelettique – MY 32) et traçage des membranes, marquées durablement au cmDiI.

Les observations histologiques pratiquées en aveugle par un pathologiste expérimenté sont résumées dans le tableau 3. Les coupes de VD des animaux du groupe 1 étaient normales (myocarde sain). Cinq des 7 animaux greffés dans le groupe 2 (5 survivants et 2 décès précoces) ont présenté des structures très positives en immuno-marquage MY32. Ces champs étaient soit isolés en foyers ou très larges (champs microscopiques s'étendant de l'endo à l'épicarde) selon les coupes (voir *Figure 16*). Aucun marquage MY32 n'a été retrouvé dans les deux autres groupes. Un certain degré d'inflammation et

de fibrose a toujours été retrouvé dans les lames des animaux du groupe 2 et 3. De nombreux vaisseaux ont également été remarqués au sein de ces zones. Le marquage au cmDiI a, quant à lui, été retrouvé sur toutes les lames des animaux du groupe 2 (voir *Figure 17*).

Tableau 3 : Résumé de l'étude histologique des trois groupes

LES GROUPES	RESUME	
	Immuno-marquage	fluorescence
Groupe 1 (cerclage simple)	Architecture tissulaire et cellulaire normale (MY32-)	Toutes les cellules DiI -
Groupe 2 (cerclage + cellules)	1 - Quelques foyers de fibroses/inflammation associés dans un cas à des microcalcifications 2 - Cellules MY32+ isolées ou en amas de taille variable chez 5/7 animaux 3 - Quelques champs très larges, recouverts de cellules MY32 (de l'endocarde à l'épicarde) 4 - Myotubes associés aux cellules MY32	Nombreux champs avec des cellules DiI + sur tous les animaux
Groupe 3 (cerclage + placebo)	Un à plusieurs foyers fibreux ne contenant que des cellules nécrotiques ou calcifiées (MY32-)	Toutes les cellules DiI -

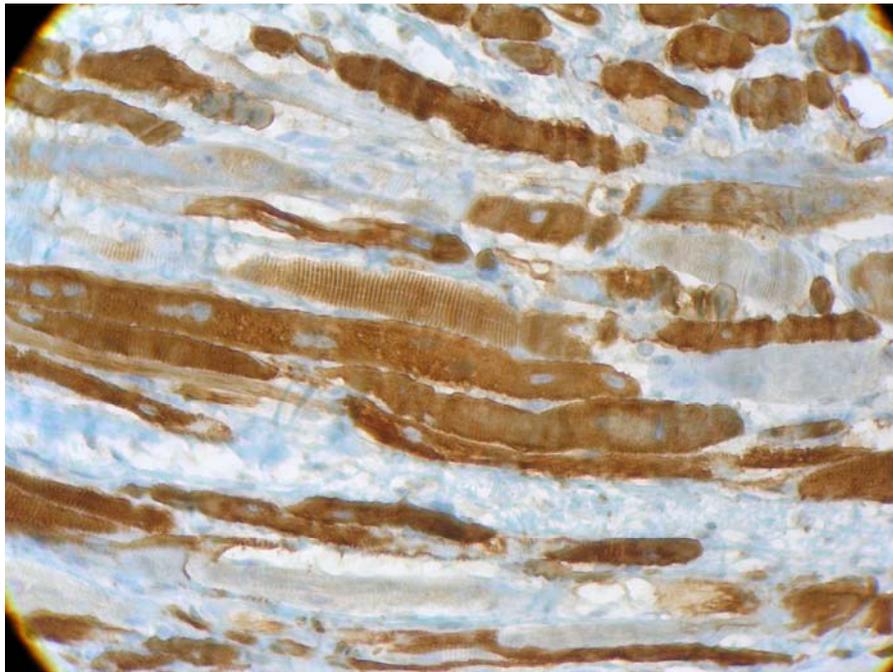
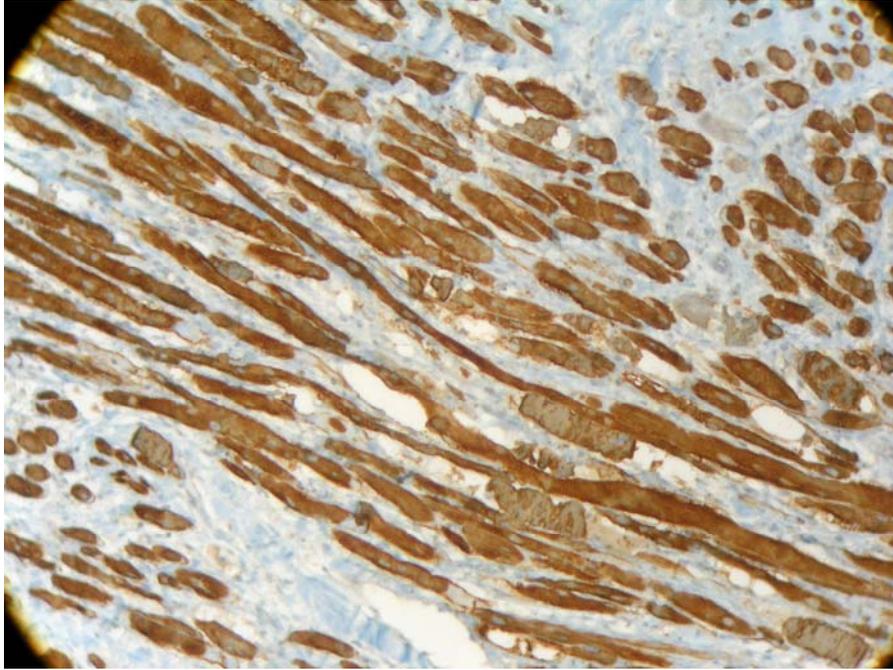
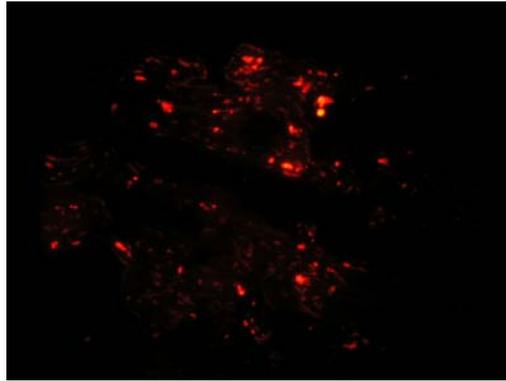
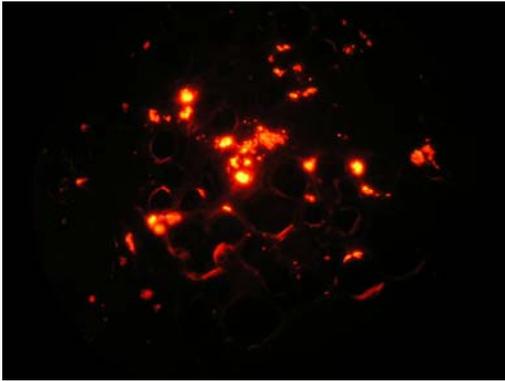
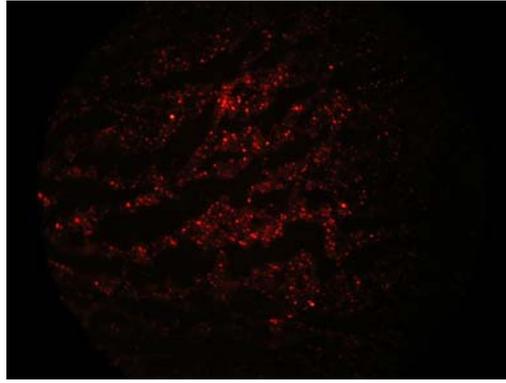
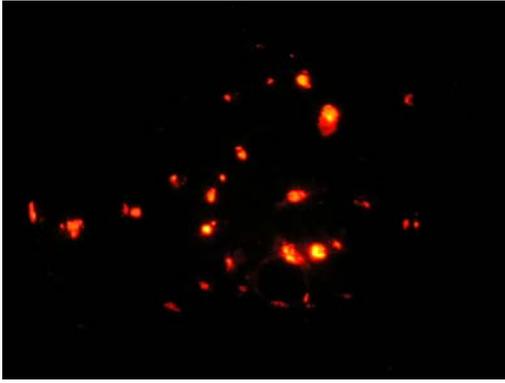


Figure 16: Cellules MY32 positives (en marron) dans le myocarde du ventricule droit d'un agneau greffé avec une préparation cellulaire sans culture



Microscopie × 400

Microscopie × 100

Figure 17: Cellules marquées par le cmDiI observées en fluorescence rouge dans les cryocoupes de deux animaux greffés

DISCUSSION

I. Préparation cellulaire issue du muscle squelettique et résultats histologiques

Le principe de la transplantation cellulaire repose sur la contribution des cellules transplantées à l'amélioration des performances contractiles (contractilité ou compliance) ou à la perfusion du myocarde. De nombreux types cellulaires ont été évalués : cardiomyocytes embryonnaires ou adultes [43, 59, 62, 64, 66, 97, 101, 102, 107, 127, 134], lignées cellulaires [50, 51], myoblastes d'origine musculaire squelettique [20, 27, 47, 71, 73, 80, 91, 92, 95, 98, 116, 119, 123, 133] ou lisse [63, 131, 132], cellules souches d'origine médullaire [41, 49, 54, 83, 84, 85, 86, 125, 126] ou embryonnaire [48]. L'intérêt principal des cellules myo-satellites est que ces cellules comportent déjà un appareil contractile, qu'elles tolèrent l'ischémie et qu'elles sont relativement faciles à isoler et à cultiver. La critique principale théorique est que ces cellules ne sont pas programmées pour endurer des millions de contractions cycliques comme les cardiomyocytes. En outre, la plupart des publications font état de l'absence de couplage électrique *in vivo* entre les cellules satellites greffées et les cardiomyocytes résidents. Néanmoins, nombreuses sont les publications traduisant une amélioration fonctionnelle avec ce type cellulaire, sur des modèles ischémiques ou dilatés [40, 42, 65, 88, 91, 100, 101, 117, 119]. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer cette amélioration : participation active aux contractions myocardiques (couplage mécanique), amélioration de la relaxation et diminution du remodelage, enfin synthèse de signaux moléculaires (HGF, IGF) dans le microenvironnement cardiomyocytaire [76]. Cet hypothétique effet paracrine pourrait alors participer à la survie des cardiomyocytes natifs ou à l'activation de cellules souches cardiaques [2, 76].

La grande majorité des équipes travaillant sur la cardiomyoplastie cellulaire l'ont envisagée selon trois phases : biopsie, culture cellulaire / expansion *ex vivo*, puis implantation chirurgicale ou percutanée.

Un premier travail mené dans le laboratoire a montré qu'il était possible, chez la brebis, de greffer de grandes quantités de cellules myo-satellites sans les avoir préalablement cultivées [12].

Cette technique qui s'appuie sur un traitement particulier et original de la préparation cellulaire a fait l'objet d'un brevet monde déposé conjointement par la Fondation de l'Avenir, l'Institut Pasteur et le CNRS en 2002 [14].

L'enjeu de la thérapie cellulaire sans phase de culture est de trois ordres : diminuer les coûts (main d'œuvre, consommable), diminuer les risques de contamination (bactérienne, virale, prions) et raccourcir la période entre la biopsie et l'implantation. Au cours de cette étude, 3 heures ont séparé la biopsie et la greffe.

Le travail préliminaire qui avait été mené dans le laboratoire intéressait le ventricule gauche ; l'originalité de notre étude a été d'essayer cette nouvelle stratégie dans le ventricule droit, en association avec un cerclage sur la voie pulmonaire. Les résultats histologiques ont permis de démontrer la survie des cellules myo-satellites greffées. De larges champs microscopiques étaient recouverts de cellules positives au MY32 chez les animaux ayant reçu des cellules. De larges myotubes en amas ou de petits îlots ont été observés. Les cœurs témoins (pas d'injection ou injection de placebo) étaient négatifs au MY32 en immuno-histochimie. Des signes d'inflammation ont également été observés dans les lames.

Il est également possible que la transplantation de cette préparation musculaire achemine des cellules au caractère plus primitif et pluripotent, comme il a été démontré chez la souris [24, 34]. Enfin, la nature non cultivée de ces cellules pourrait leur conférer une meilleure aptitude à la multiplication et à la survie après transplantation, comme il a été observé dans le muscle squelettique [105]. Afin de déterminer si cette démarche a un sens et une application clinique potentielle, il reste à évaluer si la préparation cellulaire sans culture donne des résultats qualitatifs et quantitatifs équivalents ou supérieurs aux cellules cultivées.

II. Mode d'administration des cellules

La grande majorité des publications sur la transplantation cellulaire intramyocardique se sont intéressées à l'injection par voie épiscopidique, avec une seringue et une aiguille. L'inconvénient majeur en terme d'application humaine est le recours à une thoracotomie pour aborder le ventricule. La thoracoscopie ou l'injection endomyocardique sont des options envisageables mais des problèmes techniques restent à régler, d'une part, et la lésion iatrogène liée à l'acte mécanique d'injection reste présente, d'autre part.

Les greffes peuvent être également effectuées par voie artérielle intra-coronaire [80, 98, 112, 117, 118, 120]. Grâce à cette technique on espère diminuer la lésion associée à l'acte d'injection intramyocardique et laisse entrevoir techniquement une application humaine rapide (injection standard par un angioplasticien). Il reste néanmoins difficile d'acheminer un nombre très important de cellules mésenchymateuses dans le ventricule par injection intra-coronaire. En outre, l'approche que nous avons adoptée pour cette étude était d'amener une préparation cellulaire d'origine musculaire sans culture. Cette préparation contenait un nombre non négligeable de fragments musculaires de taille supérieure à 50µm et le risque d'ischémie par occlusion coronaire droite aurait été trop importante. Nous avons donc privilégié l'approche la plus invasive, avec ponction ventriculaire. Des troubles du rythme ventriculaire n'ont été rencontrés qu'au moment de la pénétration de l'aiguille. Ces salves d'extrasystoles ont disparu après quelques secondes et n'ont été retrouvées ni pendant la phase de surveillance postopératoire par électrocardiogramme, ni lors des visites de contrôles dans les mois suivant l'intervention. Cette information est intéressante et répond aux inquiétudes légitimes de voir les sites greffés se transformer en foyers arythmogènes.

Les deux premiers animaux du groupe avec cellules sont morts de myocardite suite à leurs 20 injections ventriculaires droite. Nous avons donc diminué le nombre d'injection à 10 et aucune complication de cette nature n'a été observée chez les autres animaux.

III. Marquage

Le marquage des cellules afin de déterminer leur destin après la greffe est, un enjeu capital de la recherche en thérapie cellulaire. Le marquage génétique demeure la meilleure méthode de marquage des cellules puisqu'il est transmis à toutes les générations cellulaires descendantes. Plusieurs gènes rapporteurs sont classiquement utilisés : green fluorescent protein (GFP), luciférase, beta gal ; mais certains problèmes demeurent : ces techniques sont assez coûteuses, nécessitent un savoir-faire particulier et un matériel biologique difficile à manipuler ; les cellules sont par la suite implantées chez des animaux qui doivent être gardés dans des conditions de confinement élevé et sont donc coûteuses ; l'immunogénicité du transgène utilisé est, en outre, un écueil difficile à évaluer. Nous avons donc préféré des marqueurs « chimiques », qui sont faciles d'utilisation et beaucoup moins chers. Nous avons préalablement testé *in vitro* le DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) marqueur fluorescent bleu de l'ADN (SigmaND) et le BrdU (5-bromo-2'-desoxyuridine) marqueur de l'ADN révélé par immunohistochimie (RocheND).

Les deux critiques classiques de ce genre de réactif est le risque de dilution rapide au cours des divisions cellulaires (faux négatif) et le risque de relargage lors de mort cellulaire, d'où le risque de marquer les cellules résidentes et ainsi de confondre une cellule native avec une cellule greffée (faux positif). Le DAPI s'est révélé être très rapidement dilué et de par sa faible liaison chimique avec l'ADN rapidement relargué dans le milieu. La qualité et l'intensité de son marquage nous a amené à conserver ce marqueur pour compter le nombre de cellules (plus précisément noyaux) par mL de préparation cellulaire sans culture.

Le BrdU est, quant à lui, un très bon marqueur nucléaire mais impose une phase de culture incompatible avec notre technique. Ainsi, après plusieurs séries de tests préliminaires nous avons retenu un marqueur carbocyaninique lipophile non génétique : le cmDiI (Chloromethylbenzamido-dérivée du DiI,) marqueur fluorescent rouge des membranes (Cell tracker, Molecular ProbesND). Ses propriétés en font un marqueur stable dans le temps et fortement lié aux cellules marquées. Nous avons pu retrouver des cellules cmDiI positives chez les 5 agneaux greffés.

D'autres stratégies ont été adoptées et en particulier dans le marquage des cellules pour les suivre *in vivo*. [8, 30, 53] Le coût et la nécessité d'un plateau technique complexe ne

nous ont pas permis d'envisager ces techniques prometteuses.

En tout état de cause, la greffe de cellules d'origine musculaire striée squelettique permet de tracer ces cellules par la révélation immuno-histochimique de la chaîne lourde de la myosine squelettique. Ce marqueur a été retrouvé abondamment dans les sites de greffe.

IV. Modèle de préparation avant « switch »

Il n'existe pas de modèle animal spontané de transposition des gros vaisseaux. Le seul modèle pertinent de la préparation du ventricule sous-pulmonaire est donc le cerclage de l'artère pulmonaire chez l'animal sain [6, 21, 22, 38, 39, 46, 58]. L'agneau a été classiquement mis à contribution pour cette intervention car c'est un animal rustique qui tolère bien les actes chirurgicaux et qui présente une croissance rapide. Ce modèle avait été préalablement utilisé dans le laboratoire pour essayer différents modes de cerclage et différents régimes (continu, intermittent). La stabilisation de la pression ventriculaire droite telle que nous l'avons décrite dans Matériels et Méthodes est la technique classique lors de pose d'un cerclage chez l'enfant. Essayer une autre technique de cerclage, plus innovante, par exemple ajustable [1, 55, 99], aurait amené un risque supplémentaire à l'étude.

V. Méthodologie et résultats des courbes pression-volume

L'intérêt principal des courbes pression-volume est la relative indépendance des valeurs obtenues de l'état de précharge et postcharge observés [113, 130]. En d'autres termes, certains des paramètres calculés (PRSW, ESPVR, EDPVR) traduisent véritablement l'état inotrope et lusitrope du myocarde, quelles que soient les conditions de charge.

Plusieurs techniques sont disponibles pour mesurer le volume ventriculaire dont deux sont classiquement utilisées pour générer des courbes pression-volume : sonomicrométrie (cristaux piezzo-électrique) [68, 82] et cathéter de conductance [6]. Cette dernière méthode présente l'avantage notable d'être peu invasive et n'interfère avec le myocarde qu'au moment de l'examen. Ainsi, aucun matériel exogène n'est laissé implanté à long terme l'animal. Cette technique a été ainsi choisie pour évaluer la

fonction ventriculaire droite des agneaux de notre étude.

Quelques publications font état de la validité des mesures obtenues par les courbes pression-volume dans le ventricule droit chez le chien et chez l'agneau [21, 22, 38, 39, 46]. Une étude en particulier a montré que la PRSW était l'indice le plus fiable pour la mesure des variations de contractilité dans le ventricule droit [46]. C'est pourquoi nous avons retenu ce paramètre, plutôt que la pente télésystolique de la relation pression-volume (ESPVR). Nos résultats s'inscrivent dans la continuité de ce qui a été précédemment publié : les pressions développées et la pente de la PRSW augmentent significativement après 2 mois de cerclage pulmonaire dans les trois groupes ($P < 0,05$). Néanmoins, aucune différence n'a été observée entre ces trois groupes.

La greffe et l'implantation de cellules myogéniques (objectivées par l'histologie) ne semble donc pas améliorer les performances contractiles du ventricule droit, lors de préparation ventriculaire avec un cerclage. Il est à noter que les effectifs mériteraient d'être augmentés dans chaque groupe (seulement 4 à 5 animaux actuellement) pour créditer nos résultats d'une valeur statistique plus solide. Mais plusieurs hypothèses peuvent être d'ores et déjà avancées :

La quantité de cellules est relativement faible : 10 à 20 millions de cellules.

L'effet attendu de ces cellules est faible par rapport aux modifications obtenues par le cerclage (qui peut doubler l'épaisseur pariétale par hypertrophie).[57]

Les cellules ont été greffées sur un cœur sain. Les cellules sont greffées dans un environnement aux capacités contractiles normales. Même si l'on peut supposer qu'un signal mécanique ou chimique est émis localement au sein des cardiomyocytes du ventricule droit lors de surcharge, la situation n'est pas la même que lors de greffe de cellules dans un territoire infarci ou dans un ventricule pathologique dilaté.

CONCLUSION

L'originalité de cette étude a été de tester la thérapie cellulaire pour traiter une affection du ventricule droit. Ce travail de recherche a permis l'exploitation d'un modèle ovin d'hypertrophie ventriculaire droite bien validé pour explorer la contribution d'un apport exogène de cellules myogéniques non cultivées.

Pour réaliser ce projet, chaque étape a dû être maîtrisée : évaluation fonctionnelle par des courbes pression-volume, biopsie musculaire, isolation et caractérisation des cellules myosatellites, optimisation du marquage, implantation des cellules et suivi du destin cellulaire dans le microenvironnement myocardique.

L'analyse anatomo-pathologique a permis d'identifier de nombreuses cellules marquées au cmDiI réparti en nombreux myotubes dans le ventricule droit de tous les animaux greffés.

L'évaluation fonctionnelle a été réalisée avec un cathéter de conductance à l'aide duquel plusieurs paramètres d'inotropisme indépendant des conditions de charge ont été mesurés : dpdt max et min, pression développée, travail d'éjection et PRSW (preload recruitable stroke work). Malgré la prise des greffes aucun des paramètres mesurés n'a montré de différence significative avec les témoins. Il n'y a pas de bénéfice thérapeutique.

Il reste à déterminer si cette absence d'amélioration des propriétés contractiles est le fruit d'une inadéquation du nombre de cellules injectées, du type cellulaire ou du mode d'injection associé à une blessure. Une modification dans le moment choisi pour implanter les cellules, ici au moment de la pose du cerclage, permettrait-elle d'obtenir des résultats fonctionnels différents?

Les techniques apprises au cours de cette année posent les bases d'un futur travail tentant de répondre à ces questions.

PERSPECTIVES

La thérapie génique appliquée aux atteintes cardiaques est un secteur en développement[78]. Plusieurs essais chez l'homme ont été publiés et sont très encourageants [69]. Des myoblastes transfectés ont déjà été utilisés en thérapie génique comme plates-formes de délivrance de molécules thérapeutique pour diverses maladies non cardiaque [104]. De même, des myoblastes ont été transfectés pour sur-exprimer de la connexine-43, élément clé des gap-junctions[114]. Cette stratégie pourrait être mise à profit dans la préparation ventriculaire, en apportant dans le myocarde par l'intermédiaire de myoblastes, des facteurs de différenciation cellulaire ou des facteurs de croissance (« cardiomyoplastie moléculaire ») [60, 67]. Le modèle sur lequel nous travaillons permettrait l'évaluation et l'éventuelle validation d'une telle thérapeutique.

L'étude menée cette année pourrait également être reproduite en modifiant le type cellulaire implanté. Les cellules souches autologues mésenchymateuses ou bone marrow stromal cells ont fait l'objet d'études très prometteuses [37,41,76,125,126]. Une autre option serait d'amener des cardiomyocytes autologues, prélevés à la naissance sur le ventricule droit. A cet âge, les cellules gardent encore un potentiel mitotique. Il pourrait également être intéressant d'acheminer ces cellules par voie endocoronaire, de manière contrôlée et itérative.

En outre, il serait intéressant de tester l'apport de cellules myogéniques à un autre stade de la préparation ventriculaire, peut être plusieurs jours ou semaines avant ou après le cerclage. Le décalage dans le temps exposerait les cellules greffées à des signaux moléculaires et mécaniques différents.

Enfin une voie de recherche en cours dans le laboratoire est le traçage de la préparation cellulaire sans culture avec des marqueurs génétiques. Seule cette option sera à même de répondre aux interrogations concernant le potentiel de transdifférenciation des cellules greffées.

REFERENCES

- (1) AHMADI A, REIN J, HELLBERG K, BASTANIER CH. Percutaneously adjustable pulmonary artery band. *Ann Thorac Surg* 1995; **60**:S520 –2.
- (2) AL ATTAR N, CARRION C, GHOSTINE S, GARCIN I, VILQUIN JT, HAGEGE AA, MENASCHE P. Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res.* 2003; **58**:142-8.
- (3) ANVERSA P, LERI A, KAJSTURA J, NADAL-GINARD B. Myocyte growth and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;**34**:91-105.
- (4) ANVERSA P, NADAL-GINARD B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.* 2002;**415**:240-3.
- (5) APPLGATE, R. J., C. P. CHENG, AND W. C. LITTLE. Simultaneous conductance catheter and dimension assessment of left ventricle volume in the intact animal. *Circulation*1990;**81**: 638–648.
- (6) BAAN J, VAN DER VELDE ET, DE BRUIN HG, SMEENK GJ, KOOPS J, VAN DIJK AD, TEMMERMAN D, SENDEN J, BUIS B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation.* 1984;**70**:812-23.
- (7) BAAN, J., E. T. VAN DER VELDE, H. G. DE BRUIN, G. J. SMEENK, J. KOOPS, A. D. VAN DIJK, D. TEMMERMAN, P. J. SENDEN, AND B. BUIS. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation*, 1984;**70**: 812–823.
- (8) BARBASH IM, CHOURAQUI P, BARON J, FEINBERG MS, ETZION S, TESSONE A, MILLER L, GUETTA E, ZIPORI D, KEDES LH, KLONER RA, LEOR J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003;**108**:863-8.
- (9) BELTRAMI A. ET AL. Cardiac c-kit Positive Cells Proliferate In Vitro and

Generate New Myocardium In Vivo. AHA Scientific Sessions 2001 Anaheim, 10-15 Novembre 2001

(10) BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN SM, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;**344**:1750-7.

(11) BLALOCK A, HANLON CR. The surgical treatment of complete transposition of the aorta and the pulmonary artery. *Surg Gynecol Obstet* 1950 ; **90** : 1-15

(12) BORENSTEIN N, BRUNEVAL P, HEKMATI M, BOVIN C, BEHR L, PINSET C, LABORDE F, MONTARRAS D. Noncultured, autologous, skeletal muscle cells can successfully engraft into ovine myocardium. *Circulation*. 2003 Jun 24;**107**(24):3088-92.

(13) BORENSTEIN N, CHETBOUL V, RAJNOCH C, BRUNEVAL P, CARPENTIER A. Successful cellular cardiomyoplasty in canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 2002. Sous presse.

(14) Brevet monde en cours de dépôt "Procédés pour maintenir la diversité et la plasticité cellulaire des cellules souches adultes de mammifères issues de biopsie tissulaire pour la réparation et la régénération tissulaire par thérapie cellulaire et génique". DI2001-81. Co-inventeurs : **N. Borenstein** (CERA - Fondation de l'Avenir), **D. Montarras** (Institut Pasteur), C. Pinset (CNRS - Start-up CELOGOS)

(15) CABRERIZA SE, DEAN DA, JIA CX, DICKSTEIN ML, SPOTNITZ HM. Electrical isolation of the heart. Stabilizing parallel conductance for left ventricular volume measurement. *ASAIO J*. 1997 Sep-Oct;**43**(5):M509-14.

(16) CARLSON BM. The generation of skeletal muscle : a review. *Am J Anat* 1973 ; **137** :119-128.

(17) CARPENTIER A, CHACHQUES JC – Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle : first successful clinical case. *Lancet* 1985, **1** :1267

(18) CARPENTIER A, CHACHQUES JC, GRANDJEAN P (Eds) – Cardiac Bioassist.

Futura Publishing, New York 1997 : 1-632

- (19) CD Leycom. <http://www.cardiodynamics.nl/html/frameondermeth.htm>. The conductance catheter methode. Real time quantitative assessment of cardiac function. CDLeycom 2003.
- (20) CHIU RC; ZIBAITIS A; KAO RL - Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*, 1995 ; **60**:1, 12-18
- (21) DE VROOMEN M, CARDOZO RH, STEENDIJK P, VAN BEL F, BAAN J. Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;**278**:H100-5.
- (22) DE VROOMEN M, STEENDIJK P, LOPES CARDOZO RH, BROUWERS HH, VAN BEL F, BAAN J. Enhanced systolic function of the right ventricle during respiratory distress syndrome in newborn lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;**280**:H392-400.
- (23) DI DONATO RM, FIJII AM, JONAS RA, CASTANEDA AR. Age-dependent ventricular response to pressure overload. Considerations for the arterial switch operation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992 ; **104** : 713-722
- (24) DI MARIO JX, STOCKDALE FE. Differences in the developmental fate of cultured and noncultured myoblasts when transplanted into embryonic limbs. *Exp Cell Res*. 1995;**216**:431-42.
- (25) DICKSTEIN, M. L., O. YANO, H. M. SPOTNITZ, AND D. BURKHOFF. Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc. Res.*1995 **29**: 820–826.
- (26) DOLLAR ML, YELDERMAN ML, QUINN MD, MCKOWN RC, EBERHART RC, ROSENFELD CR. Evaluation of a continuous thermodilution cardiac output catheter. *ASAIO J*. 1992 Jul-Sep;**38**(3):M351-6.
- (27) DORFMAN J, DUONG M, ZIBAITIS A, PELLETIER MP, SHUM-TIM D, LI C, CHIU RC. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;**116**:744-751.

- (28) DUPUIS C, KACHANER J, FREEDOM RM, PAYOT M, DAVIGNON A. Cardiologie pédiatrique (2^e éd). Flammarion. Paris. 1991 ; pp 376-387
- (29) FUKUDA K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*. 2001;**25**:187-93.
- (30) GAROT J, UNTERSEEH T, TEIGER E, CHAMPAGNE S, CHAZAUD B, GHERARDI R, HITTINGER L, GUERET P, RAHMOUNI A. Magnetic resonance imaging of targeted catheter-based implantation of myogenic precursor cells into infarcted left ventricular myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2003;**41**:1841-6.
- (31) GAUTRON J. Culture de cellules musculaires squelettiques. In Adolphe M, Barlouatz G. Techniques en culture de cellules animales. Edition INSERM, Paris : 231-245.
- (32) GIBBS JL, QURESHI SA, WILSON N, SMITH RR, YACOUB MH. Doppler echocardiographic comparison of haemodynamic results of one and two-stage anatomic correction of complete transposition. *Int J Cardiol* 1987 ; **18** : 85-92
- (33) GOURIOU M. Urétromyoplastie cellulaire chez la chienne. Thèse Med. Vet., Alfort, 2003, 114p.
- (34) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999;401:390-4.
- (35) HAGEGE A, SCORSIN M, SAMUEL JL, RAPPAPORT L, MENASCHE. Cardiomyoplastie cellulaire – Etat des lieux, évaluation et avenir. *Arch Mal Cœur* 1998 ; **91** : 1429-1435.
- (36) HAGEGE AA, CARRION C, MENASCHE P, VILQUIN JT, DUBOC D, MAROLLEAU JP, DESNOS M, BRUNEVALL P. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;**361**:491-2.
- (37) HAKUNO D, FUKUDA K, MAKINO S, KONISHI F, TOMITA Y, MANABE T, SUZUKI Y, UMEZAWA A, OGAWA S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation*. 2002;**105**:380-6.

- (38) HON JK, STEENDIJK P, KHAN H, WONG K, YACOUB M. Acute effects of pulmonary artery banding in sheep on right ventricle pressure-volume relations: relevance to the arterial switch operation. *Acta Physiol Scand*. 2001;**172**:97-106.
- (39) HON JK, STEENDIJK P, PETROU M, WONG K, YACOUB MH. Influence of clenbuterol treatment during six weeks of chronic right ventricular pressure overload as studied with pressure-volume analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;**122**:767-74.
- (40) HUTCHESON KA, ATKINS BZ, HUEMAN MT, HOPKINS MB, GLOWER DD, TAYLOR DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant*. 2000;**9**:359-68.
- (41) JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSCHI KK, GOODELL MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;**107**:1395-402.
- (42) JAIN M, DERSIMONIAN H, BRENNER DA, NGOY S, TELLER P, EDGE AS, ZAWADZKA A, WETZEL K, SAWYER DB, COLUCCI WS, APSTEIN CS, LIAO R. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. 2001;**103**:1920-7.
- (43) JIA ZQ, MICKLE DA, WEISEL RD, ET COLL: Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. *Transplant Proc* 1997;**29**:2093-2094.
- (44) JONAS RA, GIGLIA TM, SANDERS JP ET AL. Rapid two-stage arterial switch for transposition of the great arteries and intact ventricular septum beyond the neonatal period. *Circulation* 1989 ; **80** suppl 1 : 203-208
- (45) KAJSTURA J, ET AL. Cardiac Stem Cells Mediate Myocyte Replication in the Young and Senescent Rat Heart. AHA Scientific Sessions 2001 Anaheim, 10-15 Novembre 2001
- (46) KARUNANITHI MK, MICHNIEWICZ J, COPELAND SE, FENELEY MP. Right ventricular preload recruitable stroke work, end-systolic pressure-volume, and dP/dtmax-end-diastolic volume relations compared as indexes of right ventricular contractile

performance in conscious dogs. *Circ Res.* 1992;**70**:1169-79.

(47) KESSLER PD, BYRNE BJ. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 1999;**61**:219-242.

(48) KLUG MG, SOONPAA MH, KOH GY, FIELD LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996 ; **98** :216-224

(49) KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOFF D, WANG J, HOMMA S, EDWARDS NM, ITESCU S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;**7**:430-6.

(50) KOH GY, KLUG MG, SOONPAA MH, FIELD LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 1993;**92**:1548-1554.

(51) KOH GY, SOONPAA MH, KLUG MG, FIELD LG. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *Am J Physiol* 1993 ; **264** : H 1727-1733.

(52) KOH GY, SOONPAA MH, KLUG MG, PRIDE HP, COOPER BJ, ZIPES DP – Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J Clin Invest* 1995, **96** : 2034-2042

(53) KRAITCHMAN DL, HELDMAN AW, ATALAR E, AMADO LC, MARTIN BJ, PITTENGER MF, HARE JM, BULTE JW. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation.* 2003;**107**:2290-3.

(54) KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001;**105**:369-77.

(55) LE BRET E, BONHOEFFER P, FOLLIGUET TA, SIDI D, LABORDE F, DE LEVAL MR, VOUHE P. A new percutaneously adjustable, thoracoscopically implantable, pulmonary artery banding: an experimental study. *Ann Thorac Surg.* 2001 Oct;**72**(4):1358-61.

- (56) LECOMPTE Y ,ZANNINI L ,HAZAN E ET AL. Anatomic correction of transposition of the great arteries : new technique without use of a prosthetic conduit. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981 ; **82** : 629-631
- (57) LEEUWENBURGH BP, HELBING WA, STEENDIJK P, SCHOOF PH, BAAN J. Biventricular systolic function in young lambs subject to chronic systemic right ventricular pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;**281**:H2697-704
- (58) LEEUWENBURGH BP, HELBING WA, STEENDIJK P, SCHOOF PH, BAAN J. Effects of acute left ventricular unloading on right ventricular function in normal and chronic right ventricular pressure-overloaded lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;**125**:481-90.
- (59) LEOR J, PATTERSON M, QUINONES MJ, KEDES LH, KLONER RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium ? *Circulation* 1996 ; **94**(II) 332-336.
- (60) LEOR J, PRENTICE HOWARD, SARTORELLI V, ET AL. Gene transfer and cell transplant : an experimental approach to repair a 'broken heart'. *Cardiovasc Res* 1997 ; **35** : 431-441.
- (61) LERI A, QUAINI F, KAJSTURA J, ANVERSA P. Myocyte death and myocyte regeneration in the failing human heart. *Ital Heart J*. 2001;2 Suppl **3**:12S-14S.
- (62) LI RK, JIA ZQ, WEISEL RD, ET COLL: Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996;**62**:654-60; discussion 660-1.
- (63) LI RK, JIA ZQ, WEISEL RD, MICKEL DAG, MERANTE F. Smooth muscle cells transplanted into myocardial scar tissue improves heart function (Abstract). *American Heart Association - 71st Scientific Sessions*, Dallas, Texas, Nov 8-11, 1998
- (64) LI RK, MIKLE DA, WEISEL RD, ET AL. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. *Circulation* 1997 ; **96** (II) : 79-86.
- (65) LI RK, WEISEL RD, MICKLE DA, JIA ZQ, KIM EJ, SAKAI T, TOMITA S,

SCHWARTZ L, IWANOCHKO M, HUSAIN M, CUSIMANO RJ, BURNS RJ, YAU TM. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;**119**:62-8.

(66) LI RK, YAU TM, SAKAI T, MICKLE DA, WEISEL RD: Cell therapy to repair broken hearts. *Can J Cardiol* 1998;**14**:735-744.

(67) LI Y, TAKEMURA G, KOSAI K, YUGE K, NAGANO S, ESAKI M, GOTO K, TAKAHASHI T, HAYAKAWA K, KODA M, KAWASE Y, MARUYAMA R, OKADA H, MINATOBUCHI S, MIZUGUCHI H, FUJIWARA T, FUJIWARA H. Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation.* 2003;**107**:2499-506.

(68) LITTLE WC, CHENG CP, MUMMA M, IGARASHI Y, VINTEN-JOHANSEN J, JOHNSTON WE. Comparison of measures of left ventricular contractile performance derived from pressure-volume loops in conscious dogs. *Circulation.* 1989;**80**:1378-87.

(69) LOSORDO DW, VALE PR, HENDEL RC, MILLIKEN CE, FORTUIN FD, CUMMINGS N, SCHATZ RA, ASAHARA T, ISNER JM, KUNTZ RE. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation.* 2002;**105**:2012-8.

(70) MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, ET AL. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999, **103** (5) ; 697-705

(71) MARELLI D, DESROSIER C, EL-ALFY M, KAO RL, CHIU RC. Cell transplantation for myocardial repair : an experimental approach. *Cell Transplant* 1992 ; **1** :383-90.

(72) MARTINOT S, ROBIN J, VEDRINNE C, FRANCK M, CHAMPSAUR G. Hemodynamics of right circulation in ewes: normal values. *Vet Res.* 1996;**27**(1):63-9. French.

(73) MENASCHE P, HAGEGE AA, SCORSIN M, POUZET B, DESNOS M, DUBOC D, SCHWARTZ K, VILQUIN JT, MAROLLEAU JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001;**357**:279-80.

- (74) MENASCHE P, HAGEGE AA, SCORSIN M, POUZET B, DESNOS M, DUBOC D, SCHWARTZ K, VILQUIN JT, MAROLLEAU JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;**357**:279-80.
- (75) 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. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;**41**:1078-83.
- (76) MENASCHE P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg*. 2003;**75**:S20-8.
- (77) MONTARRAS D, LINDON C, PINSET C, ET AL. Cultured myf5 null and myoD null muscle precursor cells display distinct growth defects. *Biol Cell*. 2000;**92**:565-72.
- (78) MORISHITA R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J*. 2002;**66**:1077-86.
- (79) MURAD N, TUCCI PJ. Developed pressure data may provide misinformation when used alone to evaluate systolic function in isovolumetric left ventricle preparations. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Jun;**32**(6):773-6.
- (80) MURRY CE, WISEMAN RW, SCHWARTZ SM, HAUSCHKA SD – Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest*. 1996. **98** :2512-2523
- (81) National Institutes of Health. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23, Revised 1996
- (82) NICOLOSI AC, HETTRICK DA, WARLTIER DC. Assessment of right ventricular function in swine using sonomicrometry and conductance. *Ann Thorac Surg*. 1996;**61**:1381-7; discussion 1387-8.
- (83) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;**938**:221-

9; discussion 229-30.

(84) 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. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;**410**:701-5.

(85) ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LI B, ANDERSON S, BODINE D, PICKEL J, LERI A, NADAL-GINARD B, ANVERSA P. Exogenous Hematopoietic Stem Cells Can Regenerate Infarcted Myocardium. *Circulation*. 2000;**102**:g2672-.

(86) ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;**98**:10344-9.

(87) PAGANI FD, DERSIMONIAN H, ZAWADZKA A, WETZEL K, EDGE AS, JACOBY DB, DINSMORE JH, WRIGHT S, ARETZ TH, EISEN HJ, AARONSON KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol*. 2003;**41**:879-88.

(88) POUZET B, VILQUIN JT, HAGEGE AA, SCORSIN M, MESSAS E, FISZMAN M, SCHWARTZ K, MENASCHE P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation*. 2000;**102**:III210-5.

(89) QUAINI F, URBANEK K, BELTRAMI AP, FINATO N, BELTRAMI CA, NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;**346**:5-15.

(90) QUAINI F., ET AL. Cardiac Stem cells Regenerate Myocardium in Ischemic Heart Failure. *AHA Scientific Sessions 2001 Anaheim*, 10-15 Novembre 2001

(91) RAJNOCH C, CHACHQUES JC, BERREBI A, BRUNEVAL P, BENOIT MO, CARPENTIER A. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;**121**:871-8.

(92) RAJNOCH C, CHACHQUES JC, LAJOS P, FORNES P, MIROCHNIK N,

FABIANI JN, CARPENTIER A – Cellular therapy for heart failure. *Cardiovasc Surg* 1998 ;
6 (suppl. 1) : 3

(93) RATCLIFFE MB, WALLACE AW, SALAHIEH A, HONG J, RUCH S, HALL TS. Ventricular volume, chamber stiffness, and function after anteroapical aneurysm plication in the sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Jan;**119**(1):115-24.

(94) REINECKE H, MACDONALD GH, HAUSCHKA SD, MURRY CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000 May 1;**149**(3):731-40

(95) REINECKE H, MURRY CE. Transmural replacement of myocardium after skeletal myoblast grafting into the heart. Too much of a good thing? *Cardiovasc Pathol*. 2000;**9**:337-44.

(96) REINECKE H, POPPA V, MURRY CE. Skeletal Muscle Stem Cells Do Not Transdifferentiate Into Cardiomyocytes After Cardiac Grafting. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;**34**:241-249.

(97) REINECKE H, ZHANG M, BARTOSEK T, MURRY CE. Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts. *Circulation* 1999 ; **100** : 193-202

(98) ROBINSON SW, CHO PW, LEVITSKY HI, OLSON JL, HRUBAN RH, ACKER MA, KESSLER PD. Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell Transplant* 1996;**5**:77-91.

(99) SCHLENSAK CH, SARAI K, GILDEIN HP, BEYERSDORF F. Pulmonary artery banding with a novel percutaneously bidirectionally adjustable device. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; **12**:931–3.

(100) SCORSIN M, HAGEGE A, VILQUIN JT, FISZMAN M, MAROTTE F, SAMUEL JL, RAPPAPORT L, SCHWARTZ K, MENASCHE P. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;**119**:1169-75.

- (101) SCORSINM, HAGEGE A, DOLIZY I ET AL. Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure ? *Circulation* 1997 ; **96** (suppl II) : II-188-193.
- (102) SCORSINM, HAGEGE A, MAROTTE F, ET AL. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium. *Circulation* 1997 ; **96** (suppl II) : II- 188-193.
- (103) SIMINIAK T, KALAWSKI R, FISZER D, JERZYKOWSKA O, RZEZNICZAK J, KURPISZ M. Skeletal myoblast transplantation during bypass grafting in the treatment of heart failure-phase I clinical trial feasibility study and early results. *Heart Surg Forum*. 2002;6:3.
- (104) SMITH BF, HOFFMAN RK, GIGER U, WOLFE JH. Genes transferred by retroviral vectors into normal and mutant myoblasts in primary cultures are expressed in myotubes. *Mol Cell Biol* 1990 ; **10** :3268-71.
- (105) SMYTHE GM, GROUNDS MD. Exposure to tissue culture conditions can adversely affect myoblast behavior in vivo in whole muscle grafts: implications for myoblast transfer therapy. *Cell Transplant*. 2000;**9**:379-93.
- (106) SOLDA, P. L., P. PANTALEO, S. PERLINI, A. CALCIATI, G. FINARDI, M. R. PINSKY, AND L. BERNARDI. Continuous monitoring of right ventricular volume changes using a conductance catheter in the rabbit. *J. Appl. Physiol*. 1992;**73**: 1770–1775.
- (107) SOONPAA MH, KOH GY, KLUG MG, FIELD LG. Formation of intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994 ; **264** : 98-101.
- (108) STAMATO, T. M., R. S. SZWARC, AND L. N. BENSON. Measurement of right ventricular volume by conductance catheter in closed-chest pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*1995; **269**: H869–H876.
- (109) STAMM C, WESTPHAL B, KLEINE HD, PETZSCH M, KITTNER C, KLINGE H, SCHUMICHEN C, NIENABER CA, FREUND M, STEINHOFF G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;**361**:45-6.

- (110) STARK J. Transposition of the great arteries : which operation ? *Ann Thorac Surg* 1984 ; **38** : 429-431
- (111) STRAUER BE, BOLTE HD, HEIMBURG P, RIECKER G. Coronary disease. I. A correlative study on hemodynamics and contractility in 110 patients. *Z Kardiol.* 1975 Apr;**64**(4):300-10. German.
- (112) STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, KOSTERING M, HERNANDEZ A, SORG RV, KOGLER G, WERNET P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;**106**:1913-8.
- (113) SUGA H, SAGAWA K, SHOUKAS AA. Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio. *Circ Res.* 1973;**32**:314-22.
- (114) SUZUKI K, BRAND NJ, ALLEN S, KHAN MA, FARRELL AO, MURTUZA B, OAKLEY RE, YACOUB MH. Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;**122**:759-66.
- (115) SUZUKI K, BRAND NJ, SMOLENSKI RT, JAYAKUMAR J, MURTUZA B, YACOUB MH. Development of a Novel Method for Cell Transplantation Through the Coronary Artery. *Circulation.* 2000;**102**:III-359-364.
- (116) SUZUKI K, MURTUZA B, SMOLENSKI RT, SAMMUT IA, SUZUKI N, KANEDA Y, YACOUB MH. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation.* 2001;**104**:I207-I212.
- (117) SUZUKI K, MURTUZA B, SUZUKI N, SMOLENSKI RT, YACOUB MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation.* 2001;**104**:I213-I217.
- (118) SUZUKI K, SMOLENSKI RT, JAYAKUMAR J, MURTUZA B, BRAND NJ, YACOUB MH. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation.* 2000;**102**:III216-21.

- (119) TAYLOR DA, ATKINS BZ, HUNGSPREUGS P, ET AL. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;**4**:929-933.
- (120) TAYLOR DA, SILVESTRY SC, BISHOP CP ET AL. Arterial delivery of primary autologous skeletal myoblast into rabbit heart. A molecular approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians* 1997 ; **109** (3) : 245-253.
- (121) TOMITA S, LI RK, WEISEL RD, MICKLE DA, KIM EJ, SAKAI T, JIA ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999;**100**:II247-56.
- (122) TSE HF, KWONG YL, CHAN JK, LO G, HO CL, LAU CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;**361**:47-9.
- (123) VAN METER CH, CLAYCOMB WC, DELCARPIO, JB, SMITH BM, DEGRUITER H, SMART F, OCHSNER JL – Myoblast transplantation in the porcine model : a potential technique for myocardial repair. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1995, **110**(5) : 1442-1448
- (124) VERNAN F., VOUHE P.-R.-Transposition complète des gros vaisseaux – *Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), Cardiologie-Antéiologie*, 1995 11-41.
- (125) WANG JS, SHUM-TIM D, CHEDRAWY E, CHIU RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;**122**:699-705.
- (126) WANG JS, SHUM-TIM D, GALIPEAU J, CHEDRAWY E, ELIOPOULOS N, CHIU RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;**120**:999-1005.
- (127) WATANABE E, SMITH DM, JR., DELCARPIO JB, SUN J, SMART FW, VAN METER CH, JR., CLAYCOMB WC. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant.* 1998;**7**:239-46.

- (128) WHITE RN, COBB MA, BROWNLIE SE, ET AL. Skeletal muscle extra-aortic counterpulsation in dogs with dilated cardiomyopathy. *J Small Anim Pract* 1997;**38**:554-560.
- (129) YACOUB MH, BERNHARD A, LANGE P ET AL. Clinical and hemodynamic results of the two-stage anatomic correction of simple transposition of the great arteries. *Circulation* 1980 ; **62**(suppl 1) : 190-196
- (130) YAMADA O, KAMIYA T, SUGA H. Right ventricular mechanical and energetic properties. *Jpn Circ J.* 1989;**53**:1260-8.
- (131) YOO KJ, LI RK, WEISEL RD, MICKLE DA, LI G, YAU TM. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg.* 2000;**70**:859-65.
- (132) YOO K-J, LI R-K, WEISEL RD, MICKLE DAG, JIA Z-Q, KIM E-J, TOMITA S, YAU TM. Heart Cell Transplantation Improves Heart Function in Dilated Cardiomyopathic Hamsters. *Circulation.* 2000;**102**:III-204-209.
- (133) YOON PD, KAO RL, MAGOVERN GJ. Transplanting satellite cells into damaged myocardium. *Tex Heart Int J* 1995 ; **22**(2) : 119-125
- (134) ZHANG M, METHOT D, POPPA V, FUJIO Y, WALSH K, MURRY CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;**33**:907-21.