



VIRGINIE LAMBERT^{*,**}, ANDRÉ CAPDEROU^{*,**}, ELODIE GOUADON^{**},
CATHERINE RÜCKER-MARTIN^{**}, EMMANUEL LE BRET^{*}, BERTRAND STOS^{*,**}, ALAIN SERRAF^{*,**},
MICHEL PUCEAT^{***}, JEAN-FRANÇOIS RENAUD DE LA FAVERIE^{**}

*Laboratoire Hypertension Artérielle Pulmonaire : Physiopathologie et Innovation
thérapeutique (UMR-S 999, UPS/INSERM)

**Département des Cardiopathies congénitales, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue
UFR Médecine

***INSERM – Avenir Program, stem cells ans cardiogenesis, Campus Genopole 1

Les maux du cœur



108 000 battements par jour soit près de 37 millions par an! C'est un travail titanesque dont se charge un petit organe à peine plus gros qu'un poing fermé pour assurer à lui seul la circulation sanguine dans tout notre corps. Un rôle crucial qui lui vaut l'honneur d'être le premier organe fonctionnel de l'embryon. Mais dans certains cas, il ne fonctionne pas correctement et présente des malformations à la naissance. Au Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, un laboratoire mène des recherches innovantes sur ces cardiopathies congénitales.

Le terme de cardiopathies congénitales recouvre un ensemble de malformations du cœur survenues in utero avec une incidence de près de six enfants atteints sur mille naissances. Autrefois létales à la naissance ou dans les premières années de vie, les cardiopathies congénitales sont maintenant opérées précocement en routine. Grâce aux considérables progrès accomplis au cours des dernières décennies dans la prise en charge, ces enfants survivent et l'on estime qu'environ 90% d'entre eux atteindront l'âge adulte. Par conséquent, la population totale de patients adultes atteints de cardiopathies congénitales s'accroît, d'environ 5% par an. C'est donc un véritable problème de santé publique qui émerge, avec l'apparition d'une morbidité spécifique, chez des adultes de 30 à 40 ans, atteints de cardiopathies congénitales, associée à la survenue de troubles du rythme et d'insuffisance cardiaque. Ces complications qui interviennent chez des patients considérés initialement comme guéris, sont le plus souvent la conséquence d'une défaillance du ventricule droit (figure 1), et sont liées à l'évolution naturelle de la cardiopathie ou à des lésions résiduelles post-opératoires dont le retentissement s'aggrave avec le temps. De ce fait, chez les patients adultes atteints de cardiopathies congénitales, le ventricule droit est le centre de toutes les attentions tant sa fonction conditionne le pronostic.

Contrairement au ventricule gauche, l'importance physiopathologique du ventricule droit a été jusqu'à récemment sous estimée. Parent pauvre de la cardiologie, il a longtemps été considéré comme un simple conduit dont les performances contractiles étaient supposées peu contributives à l'hémodynamique*. Aujourd'hui, sa contribution à une fonction pompe cardiaque normale est bien établie. L'un de ses rôles principaux est de maintenir, dans des conditions de charge et de circulation variables, une pression de perfusion pulmonaire suffisante pour amener le sang veineux, pauvre en oxygène, aux membranes pulmonaires qui vont permettre les échanges gazeux. Il doit également maintenir une pression veineuse sanguine basse afin d'éviter la congestion tissulaire des organes. La démonstration du rôle central de la dysfonction du ventricule droit dans le pronostic et le devenir de l'hypertension artérielle pulmonaire mais aussi de nombreuses cardiopathies acquises vient par ailleurs récemment d'être faite. Ce ventricule droit est donc désormais une priorité dans la recherche cardiovasculaire.

L'insuffisance cardiaque droite, un défi thérapeutique

Dans les cardiopathies congénitales, le ventricule droit conditionne le pronostic à long terme. La plupart de ces jeunes patients sont opérés au court de leur première année, avec à la clé une réparation anatomique complète, un excellent pronostic vital

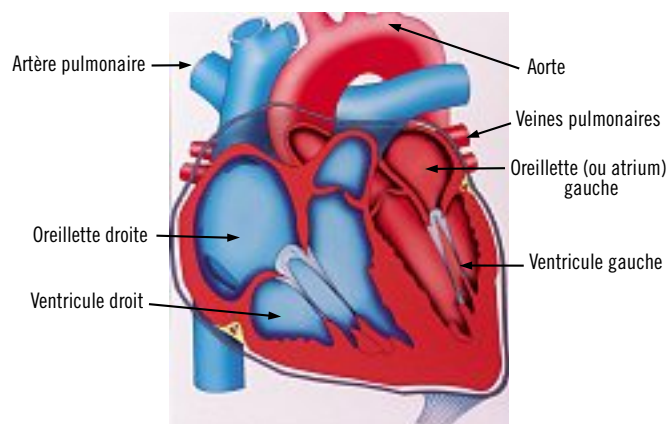
et une qualité de vie normale. Mais chez certains, le ventricule droit, soumis à une surcharge chronique de volume et/ou de pression, va dysfonctionner et entraîner une morbidité (insuffisance cardiaque, troubles du rythme ventriculaires sévères) et une mortalité accrues. Le ventricule droit avec sa géométrie complexe et ses mécanismes adaptatifs particuliers reste un défi pour les cardiologues, le traitement de sa défaillance, qui repose actuellement sur des analogies par rapport au ventricule gauche, étant encore mal codifié. Peu d'études ont évalué les effets des drogues ou des techniques traditionnellement utilisées pour traiter les pathologies du cœur gauche et leurs résultats sont contradictoires.

De la nécessité à la nécessité d'un modèle expérimental

Ce déficit dans l'évaluation de thérapeutiques spécifiquement adaptées au ventricule droit, qu'elles soient à base de molécules déjà connues ou de thérapies innovantes, tient en partie à l'absence de modèle expérimental animal. Si pour des raisons épidémiologiques évidentes, de nombreux modèles reproduisant les conséquences de la diminution de l'apport sanguin (ischémie) au myocarde du ventricule gauche ont été développés, les modèles expérimentaux de dysfonction du ventricule droit sont plus rares dans la littérature et plus éloignés des situations cliniques. Le premier objectif de notre projet de recherche a donc été de caractériser chez un gros animal, le porc, dont la physiologie cardiaque est proche de celle de l'homme, un modèle de surcharge chronique tant en volume qu'en pression, du ventricule droit, permettant d'obtenir une dysfonction et destiné à tester des thérapeutiques innovantes (figure 2). Nous avons pris comme modèle de cardiopathie congénitale l'une des plus fréquentes, la tétralogie de Fallot après réparation. Alors que les différents modèles expérimentaux décrits dans la littérature s'intéressent principalement aux conséquences hémodynamiques d'une surcharge chro-

FIGURE 1

Le cœur, coupe sagittale.



© INSERM / DANIEL CARO

nique du ventricule droit et portent sur des périodes ne dépassant pas trois mois, nous sommes allés au-delà, en étudiant notre modèle sur une durée plus longue, et en analysant d'autres facettes de la fonction du ventricule droit, hémodynamique mais aussi électrique et structurale. Une cinétique de l'installation de la dysfonction du ventricule droit a ainsi pu être définie, sachant qu'elle peut aussi être appliquée à d'autres types de cardiopathies impliquant les mêmes conditions de charge. Ce modèle décrivant le remodelage du ventricule droit à un stade très précoce permet de tester des thérapeutiques prévenant l'évolution vers sa défaillance et de déterminer les

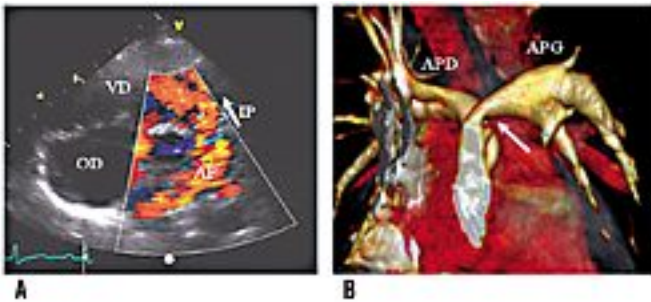
modalités optimales d'administration ainsi que le meilleur moment pour intervenir.

La thérapie cellulaire: une nouvelle perspective thérapeutique ?

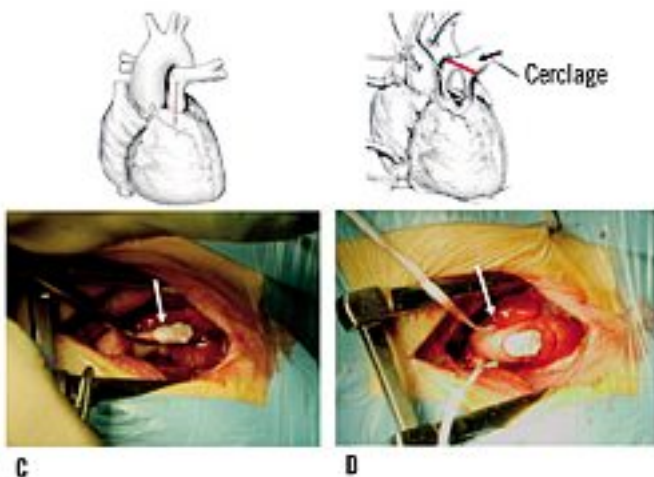
En l'absence de traitement efficace, l'issue pour les patients atteints de défaillance ventriculaire droite est la transplantation d'organe. La complexité anatomique de ces cardiopathies chez des patients ayant eu les interventions préalables multiples, ajoutent des difficultés au chirurgien et le pronostic de la transplantation reste sombre. Par ailleurs, la précocité de la défaillance cardiaque chez ces jeunes adultes de 30 à 40 ans laisse supposer la nécessité non pas d'une, mais de plusieurs transplantations successives, en raison du rejet chronique du greffon cardiaque qui conduit à sa destruction. Ces différents éléments auxquels s'ajoutent le déficit en organe et les durées d'attente prolongées justifient de défricher d'autres voies pour traiter le ventricule droit défaillant.

FIGURE 2

De la pathologie au modèle expérimental. Chez le patient réparé d'une tétralogie de Fallot, l'insuffisance pulmonaire est majeure comme en témoigne le flux de couleur rouge sur l'écho-Doppler couleur, régurgitant depuis les branches pulmonaires (A). Dans les formes sévères, il existe un rétrécissement à l'origine des deux artères pulmonaires bien visibles sur cette image par scanner multi-coupes (B, flèche).



AP: artère pulmonaire; APD: artère pulmonaire droite; APG: artère pulmonaire gauche; IP: insuffisance pulmonaire; OD: oreillette droite; VD: ventricule droit.



Ces lésions peuvent être reproduites chez l'animal: l'insuffisance pulmonaire, par la mise en place d'un patch sur la voie d'éjection du ventricule droit (C, flèche) et le rétrécissement pulmonaire par le positionnement de la bandelette de cerclage en aval de ce patch (D, flèche).

Dessin tiré du livre « Kirklín/Barratt-Boyes Cardiac Surgery » édité chez Elsevier.

Trouver les bons candidats

Parmi les thérapeutiques innovantes, la thérapie cellulaire représente un formidable espoir. Utilisant les cellules souches, cellules indifférenciées dont le potentiel de différenciation et de prolifération est conservé, elle offre la possibilité de remplacer les cellules lésées ou totalement détruites et laisse espérer la possibilité d'une réparation tissulaire. La médecine régénérative semble particulièrement attractive pour traiter le cœur mais c'est pour améliorer les cardiopathies coronariennes (ou ischémiques) que son potentiel a été le plus exploré ces dernières années. La thérapie cellulaire appliquée au ventricule droit n'a, jusqu'à présent, fait l'objet que d'exceptionnelles études, peu concluantes quant à leurs effets sur la fonction. Le type cellulaire optimal, pour améliorer la fonction et le remodelage ventriculaire, doit présenter une haute plasticité afin de générer des cardiomyocytes mais aussi des cellules vasculaires, doit pouvoir interagir avec les cellules cardiaques de l'organe hôte et former un réseau de cellules fonctionnel, de façon à protéger le cœur de la survenue d'arythmies. Les cellules souches induites à la pluripotence*, reprogrammées à partir de cellules matures de l'individu et proches par leur structure et leur potentialité des cellules souches embryonnaires, semblent présenter ces caractéristiques. Dans l'attente d'une meilleure connaissance de ces cellules, les cellules souches embryonnaires humaines apparaissent comme les meilleures candidates. Grâce à leur capacité importante de prolifération, elles sont une source potentielle de cellules régénératives pour le myocarde, à condition, dans l'optique de futures applications

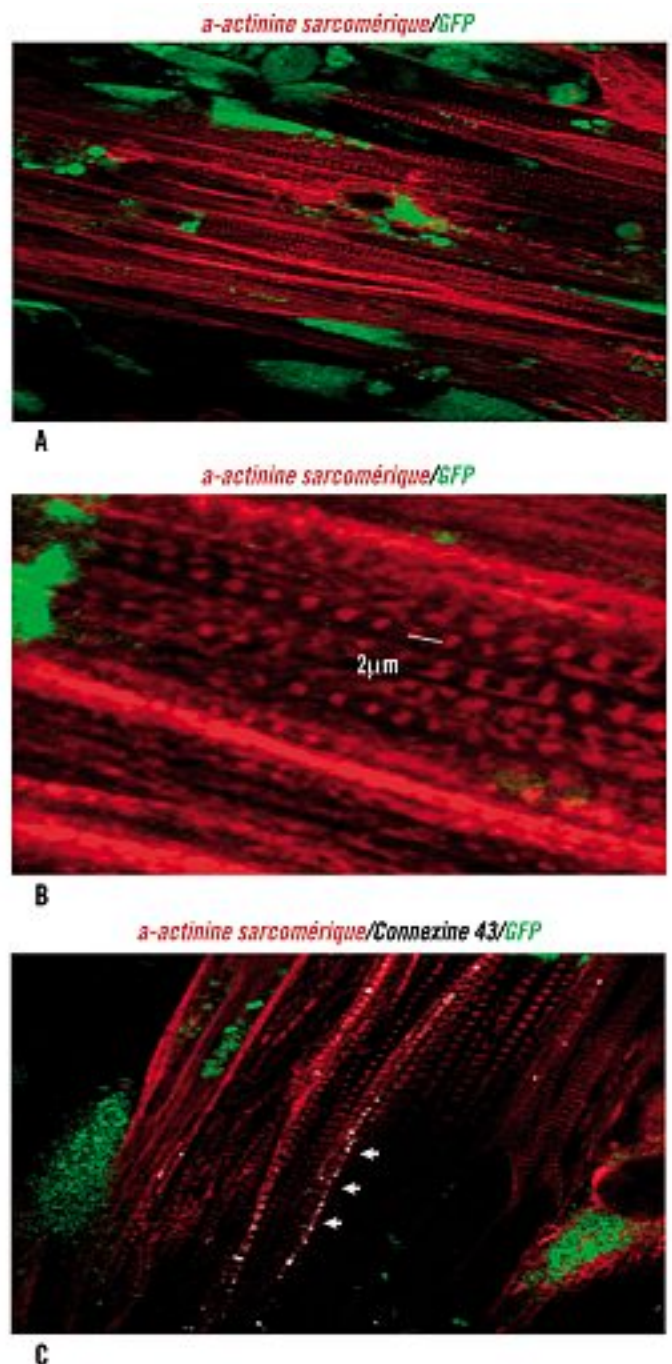
cliniques, qu'elles puissent s'engager dans la voie de la différenciation cardiaque. En effet l'un des facteurs compromettant la sécurité de la greffe est le risque de produire des tératomes* lorsque les cellules sont indifférenciées. Ainsi, des progéniteurs* précoces, capables de se diviser tout en s'engageant définitivement dans la voie de différenciation cardiaque, seraient la meilleure source de cellules pour une application clinique en pathologie cardiovasculaire. Très récemment, de tels progéniteurs ont été isolés, caractérisés *in vitro* et testés *in vivo* dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le primate non humain. Leur propriété la plus intéressante est qu'ils gardent, dans des conditions spécifiques de culture, la capacité à poursuivre leur différenciation vers les trois lignées du système cardiovasculaire, à savoir cardiaques, endothéliales et musculaires lisses. Par ailleurs, une étroite relation entre l'environnement et le degré de différenciation des progéniteurs a été démontrée sur des modèles de co-culture *in vitro* développés dans notre laboratoire. Ainsi, lorsqu'ils sont cultivés avec des myocytes et des fibroblastes* des oreillettes (ou atrium), ces progéniteurs sont capables au bout de quelques semaines de générer des sarcomères* (unité contractile des cardiomyocytes), présentant par leur taille et leur composition les caractéristiques des sarcomères matures (**figure 3A, 3B**), mais aussi d'exprimer certaines protéines constitutives des plaques jonctionnelles*, comme la connexine 43, qui contribuent à la cohésion intercellulaire et à la propagation tissulaire de la contraction myocardique (**Figure 3C**).

Des critères de choix

Notre choix d'utiliser ces progéniteurs pour requalifier le ventricule droit défaillant a été guidé par plusieurs éléments en lien direct avec la spécificité de la cardiopathie à traiter. Tout d'abord, leur capacité proliférative semble particulièrement intéressante dans une pathologie où, contrairement à la cicatrice d'infarctus du myocarde qui est localisée, les lésions myocardiques responsables de la dysfonction du ventricule droit surchargé sont diffuses et concernent la totalité du ventricule. En outre, les lésions tissulaires myocardiques du ventricule droit retrouvées en histologie, marquées par la coexistence d'un certain degré de fibrose au contact de cardiomyocytes pathologiques, constituent un terrain favorable à une différenciation et à une maturation optimales des progéniteurs. Enfin, ces progéniteurs cardiaques, en s'intégrant électriquement et en établissant des connections fonctionnelles avec les cardiomyocytes hôtes peuvent avoir un effet favorable non seulement sur la fonction contractile du ventricule droit mais aussi sur l'inhomogénéité électrique myocardique, dont on sait qu'elle reflète des anomalies fonctionnelles de la paroi myocardique, et qui est à l'origine des troubles du rythme ventriculaires compliquant l'évolution à long terme des patients.

FIGURE 3

Environnement et différenciation cellulaire, approche *in vitro*: Les progéniteurs cardiaques issus de cellules souches embryonnaires de primate non humain sont mis en culture en présence de fibroblastes et de cardiomyocytes humains. Sur ces cultures, les protéines sont visualisées par la technique d'immunomarquage, technique basée sur l'utilisation d'anticorps. Au bout de quelques semaines, les progéniteurs (*en vert*) atteignent un état de différenciation proche du cardiomyocyte mature: les sarcomères, unités contractiles de la cellule cardiaque, visualisés par la présence de l' α -actinine sarcomérique (*en rouge*), protéine spécifique, apparaissent bien striés (A) et leur longueur est d'environ 2 μ m (taille du sarcomère mature) (B). La connexine-43 (*en blanc*) est localisée le long des membranes cellulaires (*flèches*) (C) suggérant la présence de plaques jonctionnelles.
GFP: Green Fluorescent Protein.



Des résultats encourageants

Un premier essai de thérapie cellulaire a donc été réalisé sur notre modèle de dysfonction du ventricule droit par surcharge chronique, en injectant

les progéniteurs cardiaques par voie trans-myocardiques, en de multiples points de la paroi du ventricule droit. Les premiers résultats sont encourageants en termes de faisabilité et de tolérance mais aussi d'effets bénéfiques sur la fonction du ventricule

« Ventricule gauche/ventricule droit : ni tout à fait le même, ni tout à fait un autre... »

Le ventricule gauche reçoit le sang oxygéné par l'oreillette gauche et le propulse dans le corps par l'aorte. Le ventricule droit reçoit le sang veineux par l'oreillette droite et le propulse vers les poumons par l'artère pulmonaire. Le ventricule gauche est donc bien plus massif que le droit parce qu'il doit exercer une force considérable pour forcer le sang à traverser tout le corps contre la pression corporelle, tandis que le ventricule droit ne dessert que les poumons. Pour autant, le ventricule droit n'est pas un ventricule gauche moins performant et pourrait tout à fait être l'objet de cette paraphrase du poème de Paul Verlaine* tant similitudes et différences existent entre les deux ventricules du cœur. Constitué de fibres myocardiques identiques à celles du ventricule gauche, le ventricule droit répond aux mêmes mécanismes mis en jeu lorsque ses capacités d'adaptation sont dépassées. De même, les lésions structurales induites par des contraintes excessives sur la paroi du myocarde sont similaires avec un remodelage tissulaire débutant par une hypertrophie des myocytes évoluant vers une fibrose puis vers une myolyse à un stade ultime de l'insuffisance cardiaque. D'origine embryonnaire en partie différente, le ventricule droit possède des particularités anatomiques et de physiologie qui déterminent sa capacité propre à supporter des contraintes de pression et/ou de volume dans les situations pathologiques que l'on peut observer dans le suivi des cardiopathies congénitales.

Une anatomie particulière ...

La géométrie complexe du ventricule droit, difficile à modéliser, est

très différente de la forme ellipsoïde, concentrique du ventricule gauche. L'architecture des fibres myocardiques qui constituent le myocarde, forme une structure en hélice et diverses études architecturales ont montré des différences entre les deux ventricules quant à l'orientation de ces myofibrilles : contrairement au ventricule gauche qui contient une couche médiane de fibres contractiles circonférentielles génératrices de pression et responsables de la principale force du ventricule par réduction de son diamètre, le ventricule droit n'en contient pas et sa contraction est donc plus dépendante du raccourcissement des fibres longitudinales. S'ils sont différents, les deux ventricules n'en sont pas moins étroitement liés sur le plan fonctionnel, d'une part, par des fibres communes cheminant à des niveaux superficiels et profonds, d'autre part, par la cloison inter-ventriculaire qui contient des fibres longitudinales issues du ventricule droit et qui contribue à la force d'éjection systolique des deux ventricules. La fonction du ventricule droit est d'éjecter le sang vers les artères pulmonaires, contre des résistances plus faibles que le ventricule gauche en situation normale : de ce fait, le myocarde du ventricule droit est plus fin, d'une épaisseur de 2-3 mm en diastole, comparé au 8-11 mm de la paroi du ventricule gauche. Des différences existent à l'échelon structural du ventricule droit, telles qu'un nombre total de myocytes et un nombre de myocytes par gramme plus faible, ainsi qu'une masse augmentant à un rythme moins important que dans le ventricule gauche, indépendamment des conditions hémodynamiques, puisqu'elles existent à la fois en post-natal mais aussi

pendant la vie fœtale durant laquelle le ventricule droit est pourtant le ventricule dominant. Ces observations suggèrent que le potentiel de croissance est plus faible dans le ventricule droit par rapport au ventricule gauche, impliquant une capacité moindre du ventricule droit à supporter à long terme des surcharges chroniques dans des conditions pathologiques.

... pour une physiologie adaptée :

Bien qu'en relation d'interdépendance avec le ventricule gauche, le ventricule droit a un fonctionnement particulier de forte souplesse et de faible résistance, en grande partie liée à son rôle d'éjection du sang dans la circulation pulmonaire. Si le débit cardiaque est égal à celui du ventricule gauche, le coût énergétique du myocarde en est 5 à 6 fois moindre. De par sa structure myocardique plus fine et extensible et surtout grâce à sa géométrie particulière, le ventricule droit s'adapte facilement aux variations des volumes résultant des retours veineux, de la position ou des variations respiratoires, assurant ainsi le maintien d'un débit cardiaque relativement constant. Du fait de son mode de contraction, le volume du ventricule droit, lors de la systole, varie plus que la surface de sa paroi libre, permettant l'éjection d'un volume sanguin plus important au prix d'une faible modification de l'étirement pariétal. Ce modèle de contraction est conçu pour mobiliser des volumes importants et variables, mais est peu adapté pour générer une pression élevée.

*« ...Ni tout à fait la même, ni tout à fait une autre... », Extrait de « *Mon rêve familial* » Paul Verlaine (1844-1896)

droit : nous avons constaté une amélioration significative de la contractilité myocardique et un frein à l'extension du remodelage structural. Le travail se poursuit pour confirmer ces résultats préliminaires, analyser le devenir des progéniteurs injectés au sein du myocarde et rechercher des moyens pour « booster » les effets bénéfiques des progéniteurs sur la fonction du ventricule droit, par exemple par l'implantation conjointe de cellules souches mésenchymateuses* autologues connues pour leurs actions anti-inflammatoires et immuno-modulantes.

L'objectif de l'ensemble de ce projet est d'initier à terme un essai clinique. Cet essai s'adressera dans un premier temps à des patients adultes atteints de téralogie de Fallot réparée dans l'enfance, souffrant de défaillance du ventricule droit secondaire à des lésions résiduelles de la voie d'éjection droite (fuite et/ou obstruction de la circulation sanguine), et responsable d'une insuffisance cardiaque sévère et évoluée. Lorsque les paramètres morphologiques et fonctionnels laissent espérer peu de récupération malgré la correction chirurgicale des lésions, ces patients sont à l'heure actuelle orientés vers la transplantation cardiaque. La thérapie cellulaire serait alors une alternative et l'implantation de progéniteurs pourrait être effectuée lors de l'intervention chirurgicale.

Même si les progéniteurs cardiaques se confirment comme étant de bonnes cellules candidates, deux problèmes majeurs restent associés à leur utilisation et à l'extension ultérieure des indications de greffe cellulaire : le risque de rejet immunitaire et les limitations éthiques actuelles liées à l'utilisation de cellules issues d'embryons humains. Le développement récent de cellules souches induites à la pluripotence ouvre d'autres perspectives à l'utilisation des progéniteurs cardiaques d'origine embryonnaire et nos travaux, à la fois *in vivo* et *in vitro*, sont autant d'études préliminaires qui serviront de support à des projets basés sur l'utilisation de ce nouveau type cellulaire en thérapie cellulaire cardiaque. Les essais cliniques pourraient ainsi être initiés plus rapidement avec une sécurité optimale pour le patient et dans le respect de l'éthique. ■



© DR

Glossaire

Cardiomyocyte (ou myocyte) :

Cellule cardiaque contractile constitutive du myocarde.

Fibroblaste :

Cellule de la matrice extracellulaire, non contractile, présente dans le myocarde et contribuant au maintien de son architecture tissulaire.

Hémodynamique :

Qui se rapporte aux conditions mécaniques de la circulation du sang.

Mésenchymateuses (cellule souche) (CSM) :

Cellules souches tissulaires multipotentes pouvant être isolées chez l'adulte dans de nombreux tissus comme la moelle osseuse, les tissus adipeux, le placenta...

Plaques jonctionnelles :

Les jonctions communicantes ou plaques jonctionnelles sont des domaines spécialisés de la membrane cytoplasmique, localisés dans les zones de contacts intercellulaires. Elles sont composées d'une multitude de canaux aqueux qui établissent une continuité cytoplasmique entre deux cellules adjacentes.

Pluripotence :

Capacité d'une cellule indifférenciée à se transformer en n'importe quel type cellulaire de l'embryon.

Progéniteur :

Cellule issue d'une cellule souche, engagée vers un type cellulaire défini.

Sarcomère :

Unités contractiles des cardiomyocytes, les sarcomères sont des agencements de plusieurs protéines composés de trois dispositifs différents de filaments. Les sarcomères sont les agents responsables de l'apparence striée des muscles des membres et cardiaques.

Tératome :

Tumeur due à la multiplication des cellules germinales de mammifères.