



DR FABRICE DARCHE

FONDATION CŒUR - DANIEL WAGNER

OBJECTIF: METTRE AU POINT UN PACEMAKER BIOLOGIQUE!

D'APRÈS L'INTERVIEW DU DR FABRICE DARCHE (CARDIOLOGIE, HÔPITAL UNIVERSITAIRE DE HEIDELBERG)

Le Privatdozent Dr Fabrice Darche est un cardiologue et chercheur luxembourgeois basé à l'Hôpital Universitaire de Heidelberg, où il mène un projet de recherche fondamentale qui vise à améliorer le traitement des arythmies cardiaques liées au dysfonctionnement du nœud sinusal en s'appuyant sur des stratégies de thérapie cellulaire. Le développement d'un stimulateur cardiaque biologique constituerait une avancée importante dans la prise en charge des affections sinusales bradycardisantes.

PERTE D'AUTOMATICITÉ

La rythmicité spontanée du cœur est générée dans le nœud sinusal (SAN, pour *sinoatrial node*) – situé dans l'oreillette droite, à proximité de l'embouchure de la veine cave supérieure – par une population spécialisée de cellules, dites «cellules pacemaker». Les cellules du SAN humain se caractérisent notamment par une expression abondante du canal ionique activé par hyperpolarisation et modulé par les nucléotides cycliques (HCN, pour *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*) de type 4 (HCN4), qui est à l'origine du *funny current* (If), un

facteur clé pour la génération d'un rythme sinusal régulier (1).

La **dysfonction du nœud sinusal** (DNS) est l'une des principales pathologies de l'automatisme cardiaque. La DNS désigne une multitude de troubles caractérisés par l'incapacité du SAN à générer l'impulsion cardiaque. La seule thérapie actuellement disponible pour la DNS est l'implantation d'un pacemaker électronique. Cependant, ces dispositifs présentent de nombreux inconvénients. On pense à la durée de vie limitée des dispositifs (± 10 ans), au dysfonctionnement de la sonde, à la nécessité

de changer fréquemment la batterie, aux infections péri-opératoires pouvant nécessiter l'explantation du système, aux endocardites (susceptibles d'entreprendre les valves) ou encore à l'absence de réponse au système nerveux autonome (ce qui rend leur fonctionnement peu physiologique) (1). Les données épidémiologiques prévoient un besoin croissant d'implantation de pacemakers électroniques au cours des 50 prochaines années à cause du vieillissement de la population. Le développement de thérapies innovantes pour la DNS apparaît donc comme un enjeu médical et sociétal important.

METTRE AU POINT UN STIMULATEUR CARDIAQUE BIOLOGIQUE

Dans ce contexte, le développement d'un stimulateur cardiaque biologique est pertinent. Il peut se baser sur l'utilisation de cellules souches pour remplacer la perte de cellules pacemaker natives ou sur l'implantation de gènes via des plasmides ou des vecteurs viraux pour initier l'activité spontanée de cardiomyocytes auparavant quiescents.

Les **approches cellulaires** – dont, par exemple, l'utilisation de cardiomyocytes fœtaux ou de cellules du nœud sinusal humain – sont limitées par le risque de rejet immunitaire, l'immaturation, l'absence de transdifférenciation cellulaire ou des problèmes éthiques, tandis que la **thérapie génique** est limitée par des effets transitoires – les expérimentations sur des modèles porcins n'ont documenté des résultats que sur une durée limitée, de l'ordre de 2-3 mois – et des problèmes de sécurité oncologique ou arythmogène.

Selon Fabrice Darche, au total, les **stratégies d'implantation cellulaire** semblent constituer l'approche la plus prometteuse (1-3).

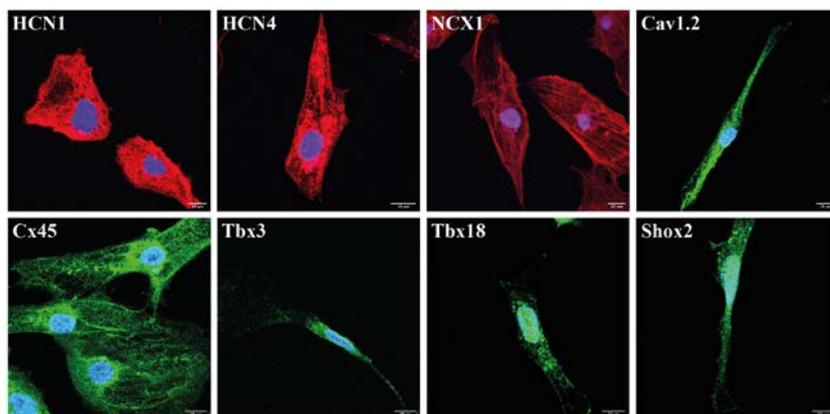
RECRÉER DES CELLULES LES PLUS PROCHES POSSIBLES DE CELLES DU NŒUD SINUSAL

Des essais de transplantation de cellules sinusales ont rapidement tourné court en raison de problèmes de rejet immunitaire, mais aussi éthiques (posés par le prélèvement de cellules sinusales chez un autre humain). Les solutions en apparence simples ne sont donc pas toujours les meilleures.

Au départ de cellules souches mésenchymateuses

Comme les **cellules souches mésenchymateuses** (*mesenchymal stem cells*, MSC) n'engendrent pas de réaction immunitaire (1), des stratégies cellulaires et génétiques ont été combinées dans une approche hybride utilisant les MSC comme véhicule pour le transfert génétique ciblé des canaux ioniques pacemaker dans le cœur. À cette fin, les MSC ont été transfectées *in vitro* en utilisant

Figure: Analyse immunocytochimique des cellules pacemaker cardiaques différenciées par le protocole le plus performant (développé par Stemcell Technologies). Les marqueurs spécifiques de l'activité pacemaker sont ici visualisés.



D'après (3).

le transfert de gènes *HCN2* ou *HCN4* et injectées dans le sous-épicaarde de grands animaux – des cochons – pour générer avec succès une activité de pacemaker *in vivo*. Cependant, celle-ci s'est limitée à une période de quelques semaines. Cela suggère que les cellules souches adultes natives peuvent ne pas s'intégrer durablement dans le tissu cardiaque et qu'avec une activité décroissante des gènes pacemaker, elles peuvent ne pas être suffisantes pour faciliter un rythme cardiaque spontané (1).

C'est pourquoi, le but du Dr Darche et de son groupe consistait non seulement à utiliser les MSC comme véhicule pour un canal ionique «pacemaker», mais aussi à les différencier en des cellules avec des caractéristiques de «pacemaker» (1). «*Ultérieurement, nous avons exploré et comparé diverses approches pour obtenir une différenciation cellulaire de type pacemaker de MSC humaines dérivées du tissu adipeux (haMSC) et de la moelle osseuse (hbMSC). Comme les protocoles de différenciation ne pouvaient cependant pas mener à une expression de HCN4, les cellules ont été ensuite soumises à un transfert lentiviral du gène HCN4 afin d'améliorer les propriétés pacemaker. Il est apparu que les cellules dérivées du tissu adipeux, plutôt que celles dérivées de la moelle osseuse, acquièrent des propriétés favorables à la stimulation cardiaque. En culture conjointe avec des myocytes ventriculaires de rats nouveau-nés et en combinaison avec la*

transduction lentivirale HCN4, un phénotype cellulaire qui contrôle et stabilise durablement le rythme a ainsi été généré» (1).

Ces résultats montrent notamment toute l'importance du choix du type cellulaire de départ et la nécessité de favoriser l'expression des canaux de type *HCN4*. De plus, contrairement aux MSC natives (donc non soumises à une différenciation), les MSC déjà différenciées *in vitro* continuaient à recevoir *in vivo* des caractéristiques pacemaker supplémentaires, comme la présence du canal *HCN4* après xénotransplantation dans des cochons (2). Rappelons en effet que les MSC différenciées ne présentaient pas de canal *HCN4 in vitro*! Finalement, les MSC différenciées et transplantées étaient capables d'assumer une fonction de pacemaker cardiaque dans les cochons, mettant ainsi en évidence leur importance pour le développement d'un stimulateur cardiaque biologique chez l'être humain (2). «*Ainsi, et c'est l'une des découvertes les plus intéressantes, on a observé que les cellules continuaient à se différencier in vivo. Autrement dit, elles acquièrent des caractéristiques souhaitables, comme l'expression de marqueurs et de canaux pacemaker – dont HCN4 – suite à des stimulations du milieu ambiant. Notons aussi que, contrairement aux cellules natives, les cellules différenciées ne se multiplient pas, réduisant ainsi le risque d'une prolifération "tumorale". Toutefois, la découverte la plus importante était le fait*

que les cellules différenciées et transplantées assumaient le rôle de stimulateur cardiaque dans les cochons.»

Ou de cellules souches pluripotentes induites humaines

De manière générale, la découverte des **cellules souches pluripotentes induites humaines** (*human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) a ouvert l'accès aux stratégies thérapeutiques cellulaires, en particulier dans le domaine de la médecine régénérative. Sur la base de leur pluripotence, les hiPSC peuvent être différenciées en tous types de cellules somatiques, ce qui les distingue des MSC, qui ne sont que multipotentes. Des différenciations *in vitro* en cellules pacemaker sont par conséquent mieux réalisables par des hiPSC que par des MSC. Cependant, les hiPSC ne disposent pas de la tolérance immunitaire des MSC, ce qui rend les approches *in vivo* plus difficiles (2). Des protocoles de différenciation des hiPSC ou de cellules souches embryonnaires humaines (*human embryonic stem cells*, hESC) en cardiomyocytes ont été établis (3).

«Nous avons établi un protocole qui prévoit une culture conjointe des hiPSC avec des cellules de type endoderme viscéral de souris (cellules END2), suivie d'une période de croissance dans un milieu de culture enrichi en sérum bovin fœtal afin de promouvoir la différenciation vers des cellules pacemaker. Ce protocole nous a permis d'atteindre un taux de différenciation en cellules pacemaker de plus de 60% (nous venions de 10%) – totalement satisfaisant – sans procéder à des manipulations génétiques récurrentes. Cependant, l'utilisation de cellules END2 de souris comporte un risque xénogénique, qui soulève des questions de sécurité concernant les applications futures chez l'homme, ainsi que celle de l'extensibilité limitée d'un système de co-culture basé sur les cellules END2. Nous avons donc cherché à établir de nouveaux protocoles conservant l'efficacité de différenciation du protocole basé sur les cellules END2, tout en se passant de ces dernières. Après de multiples comparaisons, nous nous appuyons désormais sur un protocole initialement développé par la firme Stemcell Technologies pour différencier des hiPSC ou hESC en cardiomyocytes atriaux (3). Avec succès, puisque les cellules

ainsi produites présentaient toutes les caractéristiques d'une cellule pacemaker (dont tous les canaux ioniques et facteurs de transcription importants et, surtout, la capacité à générer de manière périodique un potentiel d'action et à répondre aux stimuli adréné- et cholinergiques)» (Figure). Ceci donne une idée de la complexité des protocoles et de leur mise au point progressive, pas à pas, par essais et erreurs.

CONCLUSIONS DU MOMENT

«Nous savons donc quelles cellules produire et comment les produire. Nous devons affiner les **paramètres d'injection** (quantité de cellules, technique d'injection, site d'injection, en tenant compte de la capacité de migration des cellules mésenchymateuses [homing]) pour optimiser les résultats.»

«Reste que le principal défi qui se pose à l'heure actuelle est celui de démontrer le maintien à long terme de la fonction

pacemaker des cellules implantées. Ensuite seulement, nous pourrions envisager l'expérimentation humaine.»

«Par ailleurs, l'un des corollaires de ce projet est une **connaissance approfondie des cellules du nœud sinusal et de leurs caractéristiques**. Ce savoir pourrait potentiellement être utile dans le traitement de maladies génétiques du nœud sinusal (dans 90% des cas, le dysfonctionnement sinusal est lié à l'âge et au remplacement progressif des cellules spécialisées du nœud par du tissu conjonctif, mais dans les 10% restants, le dysfonctionnement est d'origine génétique) et la mise au point de traitements médicamenteux.» ■

Références

1. Darce FF, et al. *Life Sciences* 2019;232:116620.
2. Darce FF, et al. *World J Stem Cells* 2020;12:1133-51.
3. Darce FF, et al. *Int J Mol Sci* 2022;23:7318.

QUE RETENIR DE CET ARTICLE?

- En raison du vieillissement de la population, l'incidence des pathologies du nœud sinusal va augmenter de manière significative.
- La prise en charge actuelle repose sur le placement d'un pacemaker électronique.
- Les pacemakers souffrent de plusieurs inconvénients qui rendent souhaitable la mise au point d'alternatives pour le traitement de la dysfonction du nœud sinusal.
- Les pacemakers biologiques sont l'une des options les plus intéressantes.
- Le développement d'un stimulateur biologique peut être réalisé par des approches comprenant des stratégies thérapeutiques cellulaires et génétiques.
- Étant donné que les stratégies génétiques comportent un risque d'oncogénicité, les stratégies cellulaires constituent l'approche la plus prometteuse.
- À l'heure actuelle, les meilleurs résultats sont obtenus avec des protocoles utilisant les cellules souches pluripotentes induites humaines. Cependant, il faut également tenir compte des cellules mésenchymateuses qui, grâce à leur tolérance immunitaire, se laissent facilement transplanter sans souci de rejet immunitaire.
- Ces protocoles sont très complexes et de plus en plus performants.