

## Au cœur des cellules souches cardiaques

Luc Pardanaud



Inserm U833, Chaire de Médecine Expérimentale,  
Collège de France, 11, place Marcelin Berthelot,  
75005 Paris, France.

[luc.pardanaud@college-de-france.fr](mailto:luc.pardanaud@college-de-france.fr)

> L'intérêt des cellules souches ne fait aucun doute aujourd'hui, d'abord sur un plan purement fondamental puis en raison des perspectives thérapeutiques et financières que ce domaine suscite. De nombreuses recherches sont actuellement menées pour tenter de remonter toujours plus loin dans la hiérarchie des étapes primitives à l'origine de la diversité cellulaire d'un organisme, avec pour ambition de se rapprocher au plus près de la seule cellule réellement totipotente, le zygote. Néanmoins, plutôt que la totipotentialité, les récentes recherches nous conduisent aujourd'hui à prendre en compte la multipotentialité.

Ainsi, trois publications indépendantes [1-3] ont permis de compléter le modèle de la différenciation cardiovasculaire chez l'embryon (Figure 1). Le système cardiovasculaire, le premier système à se mettre en place, associe la différenciation d'un réseau endothélial fonctionnel et la formation du cœur, tous deux dérivés du feuillet mésodermique. Toute perturbation dans l'organisation cellulaire et moléculaire de ce système conduit presque inéluctablement à la mort de l'embryon.

Le cœur se développe à partir de deux territoires cardiaques issus de deux populations mésodermiques distinctes et apparaissant à des stades différents de l'ontogenèse [4]. Le premier territoire émerge du mésoderme splanchnopleural antérieur et forme le tube cardiaque primitif, puis contribue, plus tard, au ventricule gauche et à une partie des oreillettes [4]. Le second territoire cardiaque dérive du mésoderme pharyngien et donne naissance à l'extrémité artérielle du tube cardiaque précoce puis au ventricule droit, à

l'*outflow tract* et contribue au ventricule gauche ainsi qu'aux oreillettes [4]. Précocement, ces deux lignages cardiaques ségrègent à partir d'un précurseur commun [5]. Chacune de ces deux populations mésodermiques se caractérise par l'expression spécifique de marqueurs, en particulier les facteurs de transcription Nkx2.5 pour le premier territoire et Isl1 pour le second [4].

Chez la souris, des recherches utilisant des approches génétiques de traçage cellulaire ainsi que des cultures clonales de cellules souches (CS) embryonnaires ont permis de proposer une filiation cellulaire depuis les étapes précoces du développement jusqu'à la différenciation cardiaque terminale [1-3]. Une cellule progénitrice formant des colonies cardiovasculaires multipotentes (CV-CFC) est ainsi mise en évidence. Cette cellule a la capacité de donner naissance aux cellules myocardiques, aux cellules endothéliales (CE), endocarde compris, et aux cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Il est intéressant de noter que ce progéniteur qui exprime VEGFR2, le récepteur 2 au VEGF (*vascular endothelial growth factor*), s'individualise à partir d'une population cellulaire qui, transitoirement, a perdu l'expression de ce récepteur. En conséquence, ce progéniteur CV-CFC est différent de la population cellulaire formant des colonies blastiques VEGFR2<sup>+</sup> (BL-CFC, *blast colony-forming cell*), qui, plus précocement, s'engage vers la voie hémangioblastique pour donner naissance, dans le sac vitellin, aux CE VEGFR2<sup>+</sup> et aux cellules hématopoïétiques exprimant, par exemple, le facteur de transcription SCL/Tal. L'existence de ces deux progé-

niteurs distincts à potentialité endothéliale amène à se poser la question de la similitude ou de la différence des CE issues des BL-CFC et des CV-CFC : l'expression du gène de la neuréguline, un marqueur endocardique, dans les CV-CFC mais pas dans les colonies blastiques hémangioblastiques semble aller dans le sens d'une différence entre ces deux populations.

La coexpression de Nkx2.5 et de Isl1 par le progéniteur cardiovasculaire multipotent confirme que les lignages cardiaques primaire et secondaire partagent bien un ancêtre commun. La ségrégation des CMLV, exprimant l'actine du muscle lisse de type  $\alpha$  (SMA  $\alpha$ ) se réalise via deux progéniteurs bipotents indépendants, le premier à l'origine des CE et des CMLV, le second produisant des progéniteurs myocardiques et des CMLV. Plus tardivement, les progéniteurs myocardiques contribuent à la différenciation cardiaque terminale avec la mise en place des fibres de Purkinje et des myocytes auriculaires et ventriculaires, ces derniers exprimant le gène de la chaîne légère de la myosine de type auriculaire ou ventriculaire (MLC2a/v). Chacune des étapes de la différenciation cardiovasculaire s'accompagne de l'allumage et de l'extinction de marqueurs variés. Parmi eux, le gène *Brachyury*, un marqueur du mésoderme précoce, demeure présent jusqu'au stade du progéniteur multipotent mais disparaît lorsque la différenciation cardiovasculaire s'opère ; le récepteur c-kit (dont le ligand est le *stem cell factor*), un indicateur du potentiel de développement dans différents organes, s'exprime plus longtemps, jusqu'au stade du progéniteur cardiaque bipotent à l'origine des CMLV et des myocytes.



Il apparaît donc qu'un ancêtre commun donne naissance aux CE, aux CMLV et au lignage myocardique [1, 2]. Ce schéma, établi essentiellement à partir de résultats d'expériences *in vitro*, demande bien évidemment confirmation *in vivo*, les approches sur l'embryon étant à mon sens plus succinctement abordées dans ces articles. Si ces études ne préjugent en rien de l'élaboration rapide de protocoles thérapeutiques applicables à l'adulte,

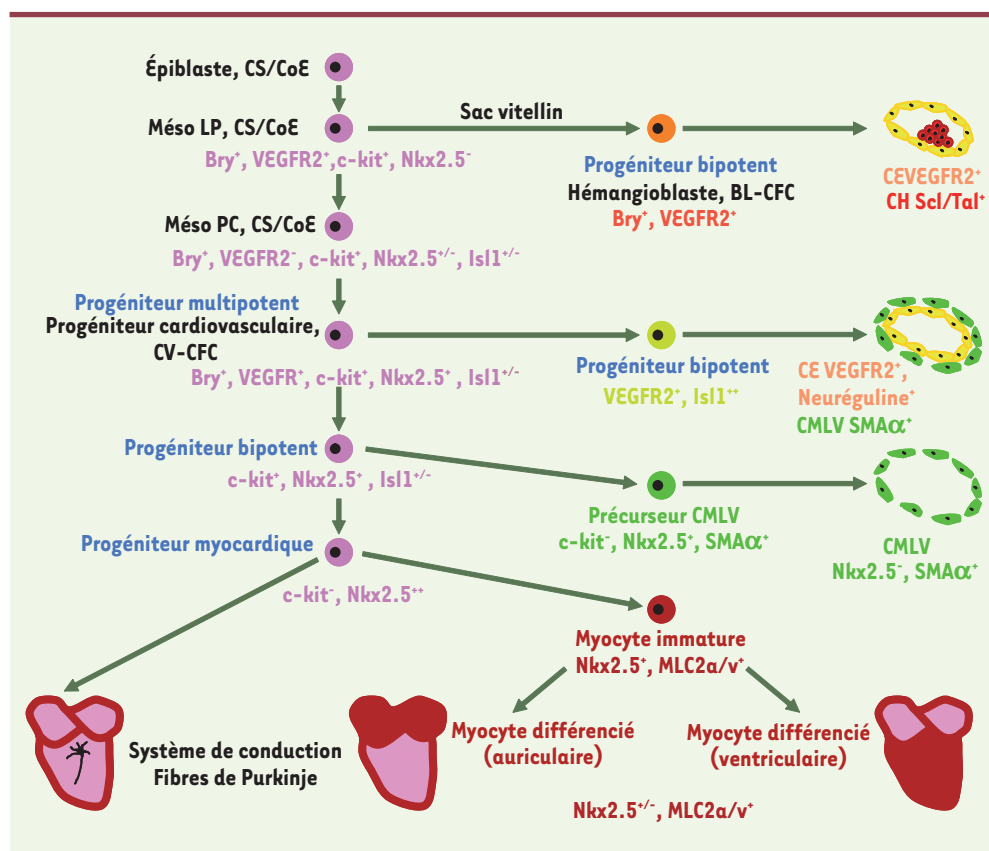
l'identification d'un progéniteur multipotent pourrait, à plus long terme, permettre d'obtenir des progéniteurs cardiaques spécifiques, développés notamment à partir de clones de CS embryonnaires. On pourrait alors imaginer de nouvelles stratégies de régénération des différentes populations cardiaques endommagées lors de diverses pathologies.

Ces résultats sont nouveaux, car jusqu'à présent, seule l'existence de pro-

généteurs bipotents donnant naissance aux CE et aux CMLV musculaires lisses avait pu être mise en évidence dans le système cardiovasculaire. Des cellules ES murines VEGFR2<sup>+</sup> sont capables de se différencier en CE et en CMLV lorsqu'elles sont injectées dans la circulation d'un embryon de poulet [6, 7]. *In vivo*, chez la souris, le somite produit des cellules à double potentialité, endothéliale et musculaire lisse [8]; chez

l'oiseau, cette capacité du somite existe *in vitro* mais pas *in vivo* [9]. En ce qui concerne l'identification d'un progéniteur commun aux CE et aux myocytes, des cellules ES murines VEGFR2<sup>+</sup> ont récemment pu donner naissance, *in vitro*, à ces deux types cellulaires [10, 11]. *In vivo*, chez le poisson zèbre, il a été montré qu'une cellule unique présente dans le territoire marginal ventral avait la capacité de se différencier en cellules cardiaques et endothéliales [12]. Chez l'oiseau, si cette capacité a été mise en évidence *in vitro* [13], les études *in vivo* n'ont pu la démontrer [14]. Chez l'adulte, il semble que les progéniteurs endothéliaux circulants humains aient également la propriété de se différencier en CE et en cellules myocardiques [15].

Si l'idée d'isoler la CS totipotente est séduisante voire fascinante, tous les travaux que nous discutons ici montrent surtout qu'un lignage donné peut émerger de progéniteurs multipotents différents



**Figure 1. Modèle de la spécification mésodermique au cours du développement cardio-vasculaire chez l'embryon.**

Au sein de l'épiblaste puis dans le mésoderme au stade de la ligne primitive (LP), comme dans les cultures de cellules souches embryonnaires (CS)/corps embryoides (CoE), des cellules formant des colonies blastiques (BL-CFC) et exprimant notamment VEGFR2 se différencient d'abord pour donner naissance aux cellules endothéliales (CE) et hématoïétiques (CH) des îlots sanguins du sac vitellin via un précurseur bipotent, l'hémangioblaste. Une journée de culture plus tard ainsi que dans le mésoderme prélevé au stade du prolongement céphalique (PC), se développent, au sein d'une population VEGFR2<sup>+</sup>, des cellules progénitrices multipotentes formant des colonies cardiovasculaires (CV-CFC) réexprimant à nouveau VEGFR2 : ces cellules donnent naissance à deux types de progéniteurs bipotents, le premier étant engagé dans la formation de CE et de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), le second dans la ségrégation de CMLV ainsi que dans celle de progéniteurs myocardiques. Les progéniteurs myocardiques conduisent à l'élaboration d'un cœur fonctionnel avec les fibres de Purkinje et les myocytes différenciés auriculaires et ventriculaires. Chaque étape de la spécification mésodermique se caractérise moléculairement par la présence et l'absence de marqueurs de lignage : la liste présentée sur ce modèle, non exhaustive, concerne des gènes majeurs cités dans les publications ayant trait à ce sujet [1-3]. *Bry* : Brachyury ; *Méso* : mésoderme.

qui, finalement, donnent naissance à des types cellulaires proches mais pas identiques, comme dans le cas des CE du sac vitellin et de celles différenciées dans le cœur. À ce titre, la découverte récente que les îlots sanguins du sac vitellin ont une origine pluriclonale [16, 17] bouscule quelque peu le dogme de l'hémangioblaste unique produisant toutes les CE et les CH dans cet organe bien que son existence à des stades de développement plus précoces ne soit pas infirmée. Ainsi, à défaut d'un hémangioblaste *princeps*, l'existence d'hémangioblastes, présents dans l'embryon ou chez l'adulte, est plus probable. Dans le même ordre d'idée, les CMLV, isolées à partir du somite ont-elles les mêmes caractéristiques que celles produites par le progéniteur cardiovasculaire multipotent ? Affaire à suivre... ♦

Inside cardiac stem cells

## RÉFÉRENCES

- Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic isl1<sup>+</sup> progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006; 127 : 1151-65.
- Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1<sup>+</sup> cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 2006; 11 : 723-32.
- Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 2006; 127 : 1137-50.
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005; 6 : 826-35.
- Meilhac SM, Esner M, Kelly RG, et al. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell* 2004; 6 : 685-98.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408 : 92-6.
- Ema M, Faloon P, Zhang WJ, et al. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* 2003; 17 : 380-93.
- Esner M, Meilhac SM, Relaix F, et al. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development* 2006; 133 : 737-49.
- Pouget C, Gautier R, Teillet MA, Jaffredo T. Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk. *Development* 2006; 133 : 1013-22.
- Iida M, Heike T, Yoshimoto M, et al. Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J* 2005; 19 : 371-8.
- Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al. Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 2005; 19 : 1534-6.
- Lee RK, Stainier DY, Weinstein BM, Fishman MC. Cardiovascular development in the zebrafish. II. Endocardial progenitors are sequestered within the heart field. *Development* 1994; 120 : 3361-6.
- Eisenberg CA, Bader D. QCE-6 : a clonal cell line with cardiac myogenic and endothelial cell potentials. *Dev Biol* 1995; 167 : 469-81.
- Cohen-Gould L, Mikawa T. The fate diversity of mesodermal cells within the heart field during chicken early embryogenesis. *Dev Biol* 1996; 177 : 265-73.
- Porat Y, Porozov S, Belkin D, et al. Isolation of an adult blood-derived progenitor cell population capable of differentiation into angiogenic, myocardial and neural lineages. *Br J Haematol* 2006; 135 : 703-14.
- Ueno H, Weissman IL. Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell* 2006; 11 : 519-33.
- Furuta C, Ema H, Takayanagi S, et al. Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early gastrulating mouse embryo. *Development* 2006; 133 : 2771-9.

## NOUVELLE

### La stratégie des lymphocytes T cytotoxiques dans l'élimination d'une tumeur solide

Alexandre Boissonnas, Luc Fetler, Sebastian Amigorena

A. Boissonnas, S. Amigorena : Inserm U653.

L. Fetler : CNRS UMR168. Institut Curie, Centre de Recherche, 26, rue d'Ulm, 75245 Paris Cedex 05, France.

[sebastian.amigorena@curie.fr](mailto:sebastian.amigorena@curie.fr)

► Les tumeurs solides représentent l'immense majorité des cancers chez l'adulte, avec une mortalité due principalement aux rechutes par métastase. Les approches thérapeutiques conventionnelles basées sur la chimiothérapie restent trop souvent inefficaces. Depuis quelques années, l'immunothérapie des cancers se développe [1] et la mise au point de traitements par vaccination est un enjeu majeur pour les années à venir. Le transfert adoptif de cellules effectrices spécifiques de tumeur est une stratégie thérapeutique qui s'est révélée parfois efficace chez l'homme [1]. Il semble que la taille des tumeurs au moment du transfert ainsi que la quantité de cellules

transférées soient critiques dans l'efficacité du rejet [2, 3]. Grâce à la microscopie bi-photonique, certains chercheurs ont pu décrire des différences de mouvement des cellules tumorales, fonction du caractère plus ou moins métastatique du modèle étudié [4]. En revanche, très peu d'informations existent sur la dynamique des cellules T cytotoxiques *in vivo*, alors même que ces cellules jouent un rôle capital dans le rejet des tumeurs. Il est donc important de caractériser le comportement de ces cellules effectrices afin de déterminer quels sont les paramètres qui déterminent leur activité cytotoxique. Nous avons développé pour cela un système

expérimental dans lequel il est possible de suivre par vidéo microscopie bi-photonique la dynamique du rejet *in vivo* d'une tumeur solide par les lymphocytes T après leur transfert adoptif [5]. Nous avons utilisé un modèle murin de réponse immunitaire anti-tumorale, induite par un thymome exprimant un antigène recombinant, l'ovalbumine. Selon que les tumeurs expriment (EG7) ou non (EL4) l'ovalbumine, nous avons suivi la réponse des lymphocytes T cytotoxiques depuis leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à leur infiltration dans la tumeur. Après injection sous-cutanée des deux types de tumeur, dans chaque flanc d'une