

Université de Montréal

Développement d'un système d'imagerie haute vitesse pour la surveillance en continue de cultures cardiaques

Par Antoine Belzil

Département de pharmacologie et physiologie, Institut de génie biomédical,
Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences appliquées (M.Sc.A) en génie biomédical

Décembre 2018

© Antoine Belzil, 2018

Université de Montréal
Département de pharmacologie et physiologie, Institut de génie biomédical,
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Développement d'un système d'imagerie haute vitesse pour la surveillance en continue
de cultures cardiaques**

Présenté par
Antoine Belzil

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mathieu Dehaes

Président-rapporteur

Philippe Comtois

Directeur de recherche

Alain Vinet

Directeur de recherche par intérim

Guy Rousseau

Membre du jury

Résumé

Nos connaissances scientifiques permettent actuellement la différenciation de cellules souches en cellules cardiaques. Cependant, les protocoles permettant cet exploit ont présentement un rendement variable, qui résulte en la création de tissus aux propriétés variables. Ceci limite à son tour le potentiel de tissus de remplacement, tel le *biopacemaker*. Dans ce contexte, un protocole de différenciation de cellules souches embryonnaires de souris a été mis au point. Afin d'optimiser ces cultures, un outil de surveillance intégré à une approche de rétroaction a été développé. Le principe de fonctionnement de cet outil repose sur l'évaluation des variations de patrons cellulaires lors de la contraction. Celle-ci est réalisée par imagerie numérique sans lentille sous une illumination partiellement cohérente d'ondes planaires. Le système permet la culture cellulaire à l'intérieur d'un incubateur et des paramètres d'optimisation de culture cellulaire modulables. Il est ainsi possible d'à la fois imager les cultures à de hautes vitesses d'acquisition, soit aussi rapides que 300 images par secondes, et de prendre des images à haute résolution, soit 4 mégapixels. Ceci permet à la fois de se renseigner sur l'organisation spatiale du tissu et ses caractéristiques contractiles, via un signal caractéristique généré à partir d'acquisitions vidéo. L'outil a été validé avec trois différents types de cardiomyocytes, soit des cardiomyocytes de rat néonataux et deux types de cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches induites (hiPSc). Le système développé permet ainsi l'observation, l'évaluation de données contractiles et la surveillance de cultures de cardiomyocytes, ce qui en fait un outil prometteur pour l'optimisation en génie tissulaire cardiaque.

Mots-clés : Imagerie continue, imagerie haute vitesse, génie tissulaire cardiaque

Abstract

Current scientific knowledge allows the differentiation of stem cells into cardiac cells. However, the protocols that allow this process have variable yields, which results in cultures with variable characteristics. In turn, this limits the potential to generate replacement tissues, such as the biopacemaker. In this context, a differentiation protocol for mouse embryonic stem cell was established. To optimise these cultures, a monitoring tool combined with a feedback approach was developed. The working principle of this tool relies on the cellular pattern variations during contraction, captured by digital lenseless imaging under partially coherent illumination. The system allows cell culture directly on the device, which can be placed into an incubator. It also allows the control of substrate rigidity and of an electrical stimulation system. It is possible to capture images at speeds up to 300 frames per seconds and high-resolution images at 4 megapixels. These images in turn inform regarding the spatial organisation of the tissue as well as its contractile properties, from a characteristic signal obtained from the high-speed videos. The device has been validated with three different cardiomyocyte types: neonatal rat and two lines of human cardiomyocytes derives from induced pluripotent stem cell (hIPSc). The developed system thus allows the observation, the evaluation of contractile properties and the monitoring of cardiomyocyte cultures, which make it a promising tool for optimisation in cardiac tissue engineering.

Keywords: Real-time Imaging, Lenseless imaging, Cardiac Tissue Engineering

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
Chapitre 1.....	6
Introduction.....	6
Contexte biologique et terminologie.....	6
Contexte scientifique de la recherche sur les cellules souches.....	8
Principaux types de cellules souches.....	9
Cellules souches embryonnaires.....	9
Cellules souches germinales.....	11
Cellules souche adultes.....	11
Cellules souches pluripotentes induites – iPSCs.....	12
Cellules souches embryonnaires.....	13
Cellules souches embryonnaires humaines versus souris.....	14
Dérivation des cellules souches embryonnaires.....	16
Amplification des cellules souches embryonnaires.....	18
Différenciation des cellules souches embryonnaires vers un phénotype cardiomyocyte.....	20
Méthodes - Culture cellulaire.....	23
Revêtement des boîtes de culture avec une solution de gélatine.....	23
Amplification Cellulaire avec couche nourricière.....	24
Amplification cellulaire sans couche nourricière.....	25
Congélation des cellules.....	26
Différenciation en cardiomyocytes.....	26
Résultats – Culture cellulaire.....	29

Cellules utilisées	29
Amplification des cellules souches embryonnaires de souris	29
Différentiation des cellules souches embryonnaires de souris	29
Chapitre 2 - Article	32
Introduction.....	33
Methods.....	35
Prototype design.....	35
Main components.....	35
Imaging sub-unit	35
Additional sensors.....	38
Prototype casing.....	38
Culture wells	39
Electrical stimulation sub-unit	41
Programming.....	41
Illumination and imaging.....	42
Electric stimulation	45
Real time analysis	45
Post processing.....	46
Validation.....	46
Neonatal rat cardiomyocyte culture	47
Commercial hiPS-CM culture.....	47
hiPS-CM culture	48
Results.....	48
Prototype assembly	48
Cell culture.....	49
Tissue Imaging.....	49
Acquisition of images of the different cell types	49
Contractile signal from videos	51
Activation maps	53
Electrical Stimulation.....	56
Discussion.....	57

Acquisition speed.....	59
Electrical stimulation potential	60
Stand-alone vs scalability	60
PDMS wells potential	61
Device's purpose in the field	61
Conclusion	63
Discussion Générale.....	64
Optimisation du biopacemaker	64
Stimulation Électrique	65
Bassins de culture	66
Évaluation de la cardiotoxicité.....	67
Protocole de différenciation.....	68
Difficultés rencontrées	70
Acquisition d'image.....	70
Bassins de culture	71
Circuit de stimulation électrique.....	72
Continuité du projet	72
Interface graphique convivial	73
Parallélisation de la surveillance.....	73
Température interne du système	74
Autres améliorations possibles	74
Conclusion	76
Bibliographie.....	77

Liste des figures

Figure 1: Immunomarquage d'un tissu dérivé par le protocole proposé **Error! Bookmark not defined.**

Figure 2 : Imaging module design	37
Figure 3 : Design of the PDMS culture well.....	40
Figure 4 : Electrical stimulation module.....	422
Figure 5: Schematic representation of the high level interactions	444
Figure 6 : Different cell lines captured and monitored with the device.....	50
Figure 7 : Contractile signals computed from videos	53
Figure 8 : Superposition of the activation map on the tissue image	55
Figure 9 : Effect of speed of acquisition on contractile signal and activation map	56
Figure 10 : Electrical stimulation validation.....	58

Liste des sigles

API : Interface de programmation d'application – *Application Programming Interface*

ASC : Cellule souche adulte – *Adult Stem Cell*

BPF : Bonne pratique de fabrication

DAC : Convertisseur numérique digital – *Digital to Analog converter*

ESC : Cellule souche embryonnaire – *Embryonic Stem Cell*

FPS : Images par seconde – *Frames per second*

GUI : Interface usager graphique – *Graphical User Interface*

hESC : Cellule souche embryonnaire humaine – *Human Embryonic Stem Cell*

hiPSC : Cellule souche pluripotente induite humaine – *Human Induced Pluripotent Stem cell*

ICM : Masse cellulaire interne – *Inner Cellular Mass*

iPSC : Cellule souche pluripotente induite – *Induced Pluripotent Stem cell*

LAPS : Capteurs potentiométriques adaptables à la lumière – *Light addressable potentiometric sensors*

LED : Diode électroluminescente – *Light-emitting Diode*

MEA : Matrices de microélectrodes – *Microelectrode Arrays*

mESC : Cellule souche embryonnaire de souris – *Mouse Embryonic Stem Cell*

NRCM : Cardiomyocyte de rat néonataux – *Neonatal rat cardiomyocytes*

PLA : Acide polylactique – *Polylactic Acid*

PMEF : Fibroblaste primaire d'embryon de souris – *Primary Mouse Embryo Fibroblast*

Liste des abréviations

CM : Cardiomyocyte

PDMS : Polydimethylsiloxane

Remerciements

Ce projet de maîtrise n'aurait été possible sans le support et la contribution de plusieurs personnes. Je tiens premièrement à remercier ma famille et mes amis qui m'ont encouragé vers les études supérieures et qui m'ont gardé motivé tout au long de mon parcours.

J'aimerais remercier particulièrement mon superviseur, Philippe Comtois, pour sa confiance envers moi, son aide, ses conseils ainsi que son support tout au long du projet. Il a su guider mon projet et me faire développer un ensemble de compétences passionnantes.

J'aimerais aussi remercier Roselle Gélinas pour son implication et sa collaboration dans la culture de cellules souches et leur différenciation. Ce fut un grand plaisir de travailler avec elle.

Également, j'aimerais remercier les membres de mon laboratoire et de l'institut de cardiologie de Montréal qui m'ont aidé durant mon projet. En particulier, Alexandre Blanchette, James Elber Duverger et Claudine Beauchamp qui m'ont coaché au début de ma maîtrise.

Introduction

Le génie biomédical se définit par son intégration de multiples domaines du génie, entre autres, la mécanique, l'électrique, la physique et l'informatique, à ceux de la médecine et de la biologie. Il est ainsi logique qu'une maîtrise en génie biomédical combine ces domaines afin d'intégrer les concepts multidisciplinaires et permettre l'avancement de la technologie biomédicale. Le projet de maîtrise présenté dans ce présent mémoire comporte deux axes principaux, soit le développement d'un système d'imagerie de culture cellulaire cardiaque et le développement d'un protocole de différenciation de cellules souches vers un phénotype de cardiomyocyte. Les cardiomyocytes obtenus par différenciation et la méthodologie mise en place serviront aux projets d'autres étudiants du laboratoire tandis que le prototype développé a plutôt servi à un projet en collaboration avec d'autres laboratoires et servira dans le futur à plusieurs autres projets, tel l'optimisation des feuillets *biopacemakers*.

Le sujet de ce mémoire s'insère dans le projet ultime du laboratoire d'instrumentation et modélisation cardiovasculaire de l'institut de cardiologie de Montréal, qui a pour objectif de créer des feuillets de cellules cardiaques présentant de la contraction spontanée afin de restaurer la fonction naturelle du cœur aux patients atteints d'un nœud sinusal dysfonctionnel. Le nœud sinusal est un regroupement de cellules cardiaques, situées dans la partie supérieure droite du cœur, responsable du déclenchement de la propagation de l'onde de dépolarisation qui entraîne la contraction cardiaque normale (Bouman and Jongsma 1986). Il est, en d'autres mots, le pacemaker naturel du cœur. S'il est défectueux, le cœur ne fonctionne plus correctement, ce qui peut ultimement entraîner la mort, d'où l'importance des pacemakers électriques qui peuvent assurer un déclenchement stable des contractions cardiaques. En remplaçant le pacemaker électrique traditionnel par un feuillet de cellules, autrement connu sous le nom de *biopacemaker*, il serait possible de réduire les complications liées au pacemaker électrique en plus d'améliorer la qualité de vie des patients. Par exemple, une des limitations du pacemaker électrique est la durée de vie limitée de sa batterie qui, une fois vidée, doit être changée périodiquement via une chirurgie invasive (Rosen et al. 2004). De plus, les électrodes utilisées par les pacemakers électriques peuvent parfois mal fonctionner ou se déplacer de l'endroit optimal de stimulation, empêchant ainsi le bon fonctionnement de l'appareil (Kiviniemi et al. 1999). Pour ce qui est

d'améliorer la qualité de vie des patients, redonner la fonction au nœud sinusal implique que le *biopacemaker* répondrait aux stimulations des voies sympathiques et parasympathiques, ce qui est seulement partiellement permis par les pacemakers électriques actuels (Ambesh and Kapoor 2017). Ces voies sont parmi les principaux mécanismes par lesquels le système nerveux autonome contrôle la fréquence cardiaque. Par exemple, la stimulation β -adrénergique déplace positivement la dépendance en tension des canaux cycliques dépendant de nucléotides activés par hyperpolarisation, ce qui entraîne une densité de courant accrue et une dépolarisation diastolique plus rapide (El Khoury Nabil et al. 2013). Pour les patients pédiatriques, l'âge et la taille du patient, la masse du bloc d'alimentation, ainsi que la taille et la longueur du cathéter à électrodes deviennent des considérations importantes qui peuvent restreindre l'utilisation des pacemakers électriques (Rosen et al. 2004). De plus, le matériel doit être adapté à la croissance du patient, une limitation qui n'existerait pas avec un pacemaker biologique.

Dans l'optique de développer ces pacemakers biologiques, plusieurs éléments clés doivent être peaufinés avant d'envisager des essais cliniques, notamment la stabilité et la fréquence de dépolarisation. De plus, lors du développement des feuillets cellulaires, l'organisation des différents types cellulaires est présentement aléatoire, ce qui n'est pas désirable. Trois types de cellules cardiaques retrouvés naturellement sont les cellules ventriculaires, auriculaires et sinusales (Giudicessi and Ackerman 2012). Ce sont ces dernières qui ont une activité spontanée normale et rapide, soit qu'en absence de stimulus externe, elles sont capables de se dépolariser et entraîner un potentiel d'action (Giudicessi and Ackerman 2012). L'organisation optimale des feuillets afin qu'ils induisent efficacement une propagation électrique une fois implantés dans le cœur est un aspect important à considérer (Duverger et al. 2018). L'optimisation de la fréquence d'activation ainsi que la stabilité de celle-ci requièrent le développement d'outils avant d'entreprendre cette étape, d'où l'intérêt du développement du prototype qui sera décrit dans ce mémoire. Cet outil permet la surveillance des cultures de feuillets cellulaires en plus d'offrir la possibilité de moduler certains paramètres connus pour avoir un impact sur les cultures, tels que la rigidité du substrat de culture et la stimulation électrique. En surveillant en continu les cultures, il sera possible de comprendre plus précisément l'impact de ces facteurs et optimiser les feuillets de manière rétroactive.

Ultimement, les feuillets de cellules qui seront utilisés chez des patients devront être compatibles avec ceux-ci, d'où l'intérêt de cibler l'utilisation des cellules souches. Depuis 2007,

il est connu qu'il est possible de reprogrammer des cellules adultes humaines, par exemple des cellules adipeuses, en cellules souches (Takahashi et al. 2007). De plus, comme il est possible de différencier, c'est-à-dire d'orienter la spécialisation, ou en autres mots la transformation, des cellules souches en cellules cardiaques (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016), il serait possible de créer des *biopacemakers* à partir des cellules du patient et ainsi éviter la possibilité d'un rejet immunitaire. Lorsqu'un tissu provenant d'un donneur génétiquement non identique de la même espèce est greffé, il est initialement accepté, puis rejeté environ 10 à 13 jours après la greffe, un phénomène appelé *first-set rejection* (Charles A Janeway et al. 2001). Le rejet est causé par la réponse immunitaire aux allo-antigènes du greffon, des protéines qui varient d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce, et qui sont ainsi perçues comme étrangères (Charles A Janeway et al. 2001). Dans le passé, le laboratoire dans lequel le travail de maîtrise a été effectué ne travaillait pas avec des cellules souches, mais plutôt avec des cardiomyocytes de rats néonataux. Ce type de culture cellulaire a des caractéristiques semblables aux cardiomyocytes différenciés. Afin de commencer la transition vers l'utilisation de cellules souches, une partie du projet de maîtrise était d'établir les connaissances de bases et de déterminer un protocole fonctionnel afin de commencer la culture de cellules souches. Avant de passer à l'utilisation de cellules humaines, la décision fut prise de débiter avec des cellules souches de souris, dont l'accès et la culture sont plus simples. Le premier chapitre du présent ouvrage présente les connaissances de base sur les cellules souches et leur culture, avec un accent sur le type de cellules utilisées, soit les cellules souches embryonnaires. Les cellules souches sont souvent utilisées comme source cellulaire dans le génie tissulaire cardiaque. Entre autres, elles sont utilisées à des fins de médecine régénérative, comme la génération de pacemakers biologiques (Bruzauskaite et al. 2016; Rosen et al. 2004), et l'évaluation de la cardiotoxicité des médicaments (Mandenius et al. 2011). Une fois mise en place, la culture a permis l'obtention de cellules cardiaques présentant de la contraction spontanée. Toutefois, l'optimisation des techniques de culture a pris plus de temps que ce qui est typiquement alloué pour un projet de maîtrise avec un accent sur le développement d'un instrument biomédical, conséquemment les cultures ne furent pas prêtes pour leur utilisation avec le prototype développé. Ainsi, les techniques et protocoles serviront à d'autres projets et les connaissances acquises durant leur développement servent à compléter le bagage de savoir de l'ingénieur biomédical.

La majeure partie du travail de maîtrise consistait à la conception et la création d'un système d'imagerie à haute vitesse pour la surveillance en continu des cultures de cardiomyocytes. Le deuxième chapitre du présent mémoire présentera un article écrit sur ce dispositif qui sera publié dans un journal revu par les pairs. L'auteur du mémoire en est l'auteur et celui qui a effectué tous les travaux s'y rapportant, excepté pour la culture de cellules cardiaques dérivées de cellules souches humaines. Cette partie ainsi que son exécution furent réalisées en majorité par une collaboratrice. Traditionnellement, un système d'imagerie composé de lentilles optiques est utilisé pour visualiser de cultures cellulaires, par exemple un microscope avec une caméra pour la prise d'images et de série d'images (vidéo). Récemment les techniques d'imagerie sans lentille ont beaucoup évolué et peuvent maintenant compétitionner avec les techniques à base de lentilles. Ces méthodes d'imagerie reposent sur le patron de diffraction créé par un objet, capté directement sur une matrice de capteurs d'images numériques sans modification optique ni grossissement. L'image de l'objet est par la suite reconstruite numériquement à partir des patrons de diffraction. Notamment, c'est grâce à la grande production de capteurs numériques à faible coût ayant un nombre très élevé de petits pixels, ainsi qu'à l'amélioration de la puissance de calcul des unités de traitement informatique et des algorithmes de reconstruction utilisés que l'imagerie sans lentille est maintenant envisageable (Ozcan and McLeod 2016). La décision de créer un système d'imagerie sans lentille reposait sur trois de leurs avantages clés soient; la présence simultanée d'un grand champ de vision et d'une haute résolution, un faible coût de production et la possibilité d'un système portable (Ozcan and McLeod 2016). Dans la littérature, d'autres systèmes de surveillance en continue ont été proposés, dont d'autres systèmes d'imagerie sans lentille (S. B. Kim et al. 2011; Zheng et al. 2011) et les matrices de microélectrodes (*microelectrode arrays* - MEA) (Offenhäusser and Knoll 2001). Ces méthodes et leurs limitations seront détaillées plus loin. Le système d'imagerie du dispositif combine ainsi des principes d'optique servant à l'illumination de l'objet et la reconstruction de l'image, des principes de programmation servant aux différentes modalités de contrôle de la caméra et du traitement d'images, et des principes de mécanique servant à la réalisation du support et la protection du système. En plus d'une protection mécanique imprimée en plastique, des supports individuels pour chaque culture sont créés en silicone biocompatible, soit le polydiméthylsiloxane (PDMS). Ces supports, ou bassin, de PDMS servent à contenir les cellules et milieux de culture afin de limiter les fuites sur le dispositif et de permettre l'évaluation de

différentes cultures en interchangeant les bassins imagés. Également, de par leur rigidité modulable ainsi que la possibilité de créer des motifs dans leurs moules, ces bassins de PDMS permettent d'optimiser la culture cellulaire (Arshi et al. 2013; Engler et al. 2008; McDevitt et al. 2002). Finalement, des principes du génie électrique ont été utilisés afin de créer un stimulateur électrique pour les cultures. L'intérêt de la stimulation électrique réside dans la possibilité de conditionner le rythme de contraction des feuillets de cellules cardiaques (Eng et al. 2016) et favoriser la maturation des tissus dérivés de cellules souches (Chan et al. 2013; Hirt et al. 2014). La réalisation du prototype a permis l'intégration des différentes disciplines du génie biomédical dans un système prometteur pour le génie tissulaire cardiaque.

Chapitre 1

Introduction

Les cellules souches sont un sujet de recherche très d'actualité. D'une part, elles offrent un potentiel thérapeutique quasi illimité, et de l'autre, elles pourraient permettre de révéler de l'information fondamentale sur le développement humain et celui d'autres espèces. Plus précisément pour le domaine cardiaque, il a été démontré qu'il est possible d'orienter la différenciation des cellules souches vers un phénotype de cardiomyocyte (Kehat et al. 2001; He et al. 2003; Prowse et al. 2014; Kokkinopoulos et al. 2016). Elles peuvent aussi être injectées directement avant différenciation dans le tissu cardiaque, endommagé après un infarctus, et il a été montré que celles-ci ont un effet bénéfique sur le tissu cicatrisé et par le fait même sur la vie des patients (Segers and Lee 2008; Noiseux et al. 2014). Malgré qu'il est argumentable que la recherche sur les cellules souches date du début des années soixante (Stewart Sell 2003), il reste encore beaucoup à comprendre sur leur mécanisme cellulaire, leur développement et leur potentiel. Cette section cherche à fournir des connaissances de base sur les cellules souches, les techniques utilisées pour en obtenir des cellules cardiaques et présenter le travail effectué avec elles lors de la maîtrise.

Contexte biologique et terminologie

Pour débiter, il est important de comprendre ce que sont les cellules souches et où il est possible de les retrouver. Comme il sera expliqué, les cellules souches varient selon leur potentiel de différenciation et leur origine. Chaque être humain commence sa vie en tant qu'une seule cellule, soit un ovule fécondé par un spermatozoïde. Cette unique cellule va par la suite se multiplier et donner lieu à une multitude de cellules qui formeront l'être humain adulte. Bien évidemment, ceci implique que cette cellule a le potentiel de se différencier, c'est-à-dire de devenir, toutes les cellules spécialisées de l'embryon et des tissus adultes. Ce potentiel est ce qui est défini comme totipotent et est conservé par la première cellule pour les cinq à six premières divisions cellulaires. Il sera perdu progressivement lors de la détermination (Stewart Sell 2003). La détermination est un processus selon lequel les cellules souches embryonnaires (*embryonic stem cell* - ESC) perdent progressivement leur potentiel et gagnent des fonctions spécialisées. Il est à

noter que lors de premières divisions, la cellule mère se divise en deux cellules filles en tous points similaires, ce qui est connu sous le nom de division symétrique. Pour revenir au développement embryonnaire, ces premières cellules totipotentes sont nommées blastomères. Lors du développement embryonnaire normal, la blastulation suit ces premières divisions. Éventuellement, lorsque les blastomères atteignent la cinquième ou sixième division, les cellules externes du blastocyte (le corps embryonnaire à ce stade) commencent à former le placenta tandis que les cellules à l'intérieur conservent leur potentiel et formeront l'embryon. Un centre sans cellule apparaît également lors de cette étape (Stewart Sell 2003). Cette masse interne (*Inner Cellular Mass* - ICM) est l'endroit où les cellules souches embryonnaires sont collectées pour la recherche (Thomson et al. 1998). Quoique ces cellules formeront éventuellement l'ensemble des cellules spécialisées de l'être adulte, elles ne sont plus en mesure de former un placenta. Pour cette raison, elles sont dites pluripotentes. La prochaine étape du développement embryonnaire est la gastrulation, durant laquelle les trois feuillets embryonnaires primaires se forment : l'ectoderme (feuille externe), le mésoderme (feuille intermédiaire) et l'endoderme (feuille interne). C'est à cette étape que les cellules commencent à se diviser de façon asymétrique, c'est-à-dire que la cellule mère se divise en une cellule fille qui conserve son potentiel et une autre qui commence la détermination (Stewart Sell 2003). Les cellules souches mésenchymateuses (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC), qui peuvent se différencier en tissus conjonctifs, les os et vaisseaux sanguins sont d'un intérêt particulier pour le domaine cardiaque et sont dérivées du feuillet intermédiaire. Les cellules dérivées de l'ectoderme formeront la peau, les appendices dermiques, le cerveau et les tissus neuronaux, tandis que celles dérivées de l'endoderme formeront le tube digestif et les organes internes glandulaires (Stewart Sell 2003). En réalité, avec la progression, les cellules perdent leur potentiel et atteignent la multipotence. Ce potentiel définit les cellules pouvant encore se différencier en certaines cellules spécialisées, mais pas l'ensemble. Éventuellement, elles se retrouvent être hautement spécialisées et perdent leur potentiel de différenciation. Toutefois, même chez l'adulte il reste certaines cellules avec un potentiel de différenciation, même qu'on croit que la majorité des organes ont leur ensemble de cellules multipotentes, qui ont comme fonction d'entretenir leurs tissus respectifs (Knoepfler 2013). De plus, il est intéressant de noter que les cellules germinales conservent leur totipotence même dans le stade adulte (Stewart Sell 2003). C'est de celles-ci que sont dérivées les cellules somatiques via la méiose.

De ce survol rapide du développement embryonnaire, il est possible de comprendre que les cellules souches sont importantes dans notre devenir et pourquoi leur utilisation est controversée. Sans trop vouloir rentrer dans les détails, plusieurs groupes d'individus, notamment des groupes religieux, s'opposent à la recherche sur les cellules souches humaines, puisque dans le processus de cueillette, les embryons sont souvent tués et puisqu'il est difficile de trancher à partir d'où les cellules sont considérées comme un être humain (Ho, Brossard, and Scheufele 2008; Landry and Zucker 2004).

Bref, les cellules souches se retrouvent normalement chez les humains et possèdent un potentiel de différenciation qui diffère selon le stade de développement embryonnaire, quoique certaines conservent un potentiel même une fois le développement complété, afin de régénérer et maintenir les tissus spécialisés.

Contexte scientifique de la recherche sur les cellules souches

Comme déjà mentionné, plus la cellule se détermine, plus elle perd de son potentiel de différenciation. Jusqu'à tout récemment, ce processus était cru unidirectionnel, c'est-à-dire, qu'une fois complètement différenciée, la cellule était remarquablement stable (Surani 2001) et incapable de se revenir à un stade précédent. En 1997, Wilmut et son groupe ont démontré que transférer le noyau d'une cellule complètement différenciée d'un organe adulte dans un ovocyte permet la restauration de la totipotence du noyau (Wilmut et al. 1997; Surani 2001). Leurs résultats ont ainsi confirmé que la différenciation ne modifiait pas irréversiblement le matériel génétique.

La transplantation nucléaire est en quelques sortes une étape importante de la recherche sur les cellules souches. Elle fut réalisée pour la première fois dans les années trente par Commandon et de Fonbrune (Commandon & de Fonbrune, 1939) en utilisant des amibes, des cellules qui peuvent altérer leur forme, et par la suite dans les années cinquante avec des grenouilles (Briggs and King 1952). Ceci a par la suite mené aux expériences de Gurdon qui, en 1962, a démontré que le noyau d'une cellule spécialisée, soit de l'intestin d'un têtard dans son cas, contenait toute l'information nécessaire pour qu'une ovule se développe en une grenouille adulte (Gurdon 1962). Essentiellement, c'était la première démonstration qu'il était possible de « reprogrammer » les cellules vers un haut potentiel de différenciation. Cette découverte lui

valut le prix Nobel de médecine en 2012 avec le Professeur Shinya Yamanaka. La recherche du Prof. Yamanaka sera discutée dans une section future.

Principaux types de cellules souches

Afin de classer une cellule de cellule souche, celle-ci doit rencontrer deux conditions : l'auto-renouvellement et un potentiel de différenciation. L'auto-renouvellement veut essentiellement dire que la cellule peut se diviser en deux cellules filles, tandis que le potentiel implique qu'elle pourra donner lieu à une variété de types cellulaires (Knoepfler 2013). En prenant ceci en compte, il est possible de comprendre qu'une sous-division additionnelle est requise afin de mieux différencier les différentes sortes de cellules souches existantes. Comme mentionné dans la section précédente, les cellules souches sont classifiées selon leur potentiel et leur origine. En pratique, les cellules souches issues de l'ICM seront regroupées sous le terme de cellules souches embryonnaires (ESCs), toutes cellules souches non-germinales présentes chez l'adulte sous le terme de cellules souches adultes (*Adult Stem Cells* - ASCs), les cellules souches germinales sous le terme de cellules souches germinales (*Germinal Stem Cells*) et les cellules souches reprogrammées sous le terme de cellules souches pluripotentes induites (*Induced Pluripotent Stem Cells* - iPSCs). Les cellules souches fœtales et parthénopes existent également mais ne seront pas discutées dans le présent ouvrage. Brièvement, les cellules souches fœtales proviennent de fœtus avortés, tandis que les parthénopes proviennent des ovules non fertilisés grandis en embryons (Holden 2002). Vu l'objectif de cette section du mémoire, les cellules souches embryonnaires seront le focus de la prochaine sous-section, quoiqu'elles soient introduites dans celle-ci, avec les iPSCs, les cellules souches germinales et les ASCs.

Cellules souches embryonnaires

Les premiers travaux utilisant les cellules souches embryonnaires datent de la fin des années soixante, lorsque Cole et Edwards ont isolé les ESCs d'un blastocyte de lapin et les ont cultivées sur une couche nourricière (*feeder layer*). Les cellules isolées se sont éventuellement différenciées en plusieurs souches de cellules primaires différant par leur aspect morphologique et certaines fonctionnalités biochimiques, et ont pu être cultivées en continu (Cole, Edwards,

and Paul 1966). Deux ans plus tard, Gardner et son équipe ont démontré que les cellules de l'ICM étaient pluripotentes en injectant les ESCs dans des blastocystes de souris normales, qu'elles ont colonisés et où des chimères se sont développées (Gardner 1968). Le terme cellules souches embryonnaires fut introduit en 1981 par Gail R. Martin afin de différencier les cellules pluripotentes dérivées de l'embryon de celles de carcinomes embryonnaires pluripotentes dérivées du tératocarcinome. À ma connaissance, c'est Evans et Kaufman qui ont proposé et prouvé la première méthode de culture de cellules souches pluripotentes provenant de blastocystes *in vitro* de souris et Martin qui l'a fait à partir de cellule de l'ICM (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981).

C'est en 1998 que l'un des articles les plus importants pour le domaine a été publié par Thomson et ses collaborateurs. Essentiellement, ils ont été les premiers à créer des lignées de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et à les différencier *in vitro* en dérivés des trois couches germinales embryonnaires, soit l'épithélium intestinal; le cartilage, les os, les muscles lisses et striés; l'épithélium neural, les ganglions embryonnaires et l'épithélium squameux stratifié (endoderme, mésoderme et ectoderme respectivement). Les lignées de hESC produites ont survécu à la cryoconservation et au dégel et ont pu être cultivées pendant plusieurs mois sans perdre leur pluripotence (Thomson et al. 1998). Par la suite, il a été démontré qu'il était possible d'orienter le devenir des hESCs en utilisant différents facteurs de croissance (Schuldiner et al. 2000). Ces publications ont pavé le chemin et favorisé l'intérêt accru de la communauté scientifique d'aujourd'hui pour les cellules souches. Depuis, des lignées de cellules souches humaines ont été dérivées de différents stades embryonnaires, telles que du morula (Strelchenko et al. 2004) et du blastomère (Klimanskaya et al. 2006).

La base de la pluripotence des cellules souches de mammifères repose sur la présence des trois facteurs de transcription suivants : Oct4, Sox2, and Nanog (Ginis et al. 2004). Brièvement, Oct4 est requis pour les cellules souches embryonnaires de souris afin de maintenir leur auto-renouvellement. Sa perte est mortelle autant pour les embryons de souris que ceux d'humain dans le stade de blastocyte puisque ce facteur limite l'ICM à la lignée des trophoblastes, c'est-à-dire la couche cellulaire continue formée de fibroblastes qui limite le blastocyste, et est nécessaire à la prolifération des trophoblastes (Nichols et al. 1998). Sox2 est un facteur de transcription de la boîte HMG (Stevanovic et al. 1994). Il joue un rôle clé dans la régulation de

l'auto-renouvellement chez les ESCs de souris et d'humain, est requis pour orienter les cellules vers la lignée conduisant à la formation d'épiblaste et en son absence, il se forme un trophoctoderme (Avilion et al. 2003; Liu et al. 2013). Nanog est une protéine homéodomaine divergente qui dirige la propagation des ESCs et joue un rôle clé dans la hiérarchie des facteurs de transcription qui définit l'identité des ESCs (Chambers et al. 2003). On ne le trouve pas chez les cellules différenciées, ce qui en fait un excellent marqueur de pluripotence, tout comme les deux autres facteurs de transcription (Chambers et al. 2007).

Cellules souches germinales

Aux stades embryonnaires précoces, certaines cellules s'engagent à devenir des cellules germinales. Elles migrent vers la gonade primitive et deviennent des cellules germinales mâles ou femelles selon leurs chromosomes (Stewart Sell 2003). La démonstration de la totipotence de ces cellules souches remonte à 1970 (Stevens 1970). Pour ce faire, ils ont transplanté des cellules souches germinales dans une souris syngénique (génétiquement similaire) et observé la formation de tératocarcinomes. Il semble que le développement de tumeurs soit lié à l'absence d'agents de restriction de croissance, normalement produits par l'environnement du blastocyste en développement (Spradling, Drummond-Barbosa, and Kai 2001).

Il est ainsi à noter que des cellules souches totipotentes sont présentes chez l'homme adulte. De plus, comme les cellules souches germinales dérivent du blastocyste, qui est produit par la combinaison des deux gamètes. Comme celles-ci sont produites par des cellules souches germinales, il est logique que toutes les cellules de ce cycle soient totipotentes.

Cellules souche adultes

Les cellules souches adultes constituent une catégorie très large qui inclut essentiellement toutes les cellules dans le corps adulte qui ne sont pas dérivées de l'embryon. Il est connu que la plupart des cellules de nos organes ont une durée de vie limitée. Ainsi, leur remplacement continu est accompli par la prolifération de cellules progénitrices qui sont en fait la progéniture de leurs cellules souches tissulaires respectives. Ces cellules progénitrices se différencient en cellules matures par division asynchrone. Une fois parvenue à maturité, la progéniture ne peut plus proliférer, se différencier ni se convertir dans un autre type de tissu et finira par mourir (S. Sell and Pierce 1994). Entre temps, elles occupent les fonctions spécialisées de leur tissu respectif.

La division asynchrone des cellules progénitrices signifie qu'une cellule fille restera une progénitrice, tandis que l'autre se spécifiera via la détermination. Les ASCs se trouvent dans des niches spéciales de leurs tissus respectifs et ne se divisent normalement pas, sauf si elles sont stimulées à cause d'une perte de cellules de prolifération (Stewart Sell 2003). Ces niches sont des micro-environnements présents dans les tissus qui régulent et entretiennent les cellules souches (Morrison and Scadden 2014). Les cellules souches adultes sont multipotentes et incluent par exemple les cellules souches hématopoïétiques et cardiaques. Une limitation de celles-ci pour leur utilisation en recherche est le fait qu'elles ont des capacités d'auto-renouvellement limitées in vitro (Stewart Sell 2003).

Les cellules souches hématopoïétiques sont traditionnellement dérivées de la moelle osseuse. Elles sont probablement les cellules souches les mieux caractérisées et sont utilisées depuis longtemps lors des greffes de moelle osseuse pour traiter les leucémies (Thomas 1999). Leur destin est généralement de se différencier en tous les types de cellules sanguines, bien que ces cellules puissent également reprogrammer leur génome et redevenir multipotentes, un processus appelé la transdifférenciation (Dorshkind 2002).

L'existence de cellules souches cardiaques est encore un sujet controversé dans la communauté scientifique. D'un côté, plusieurs papiers ont été publiés depuis la première publication à leur sujet par le groupe de Piero Anversa, de l'autre, des demandes de rétractions ont été déposées sur plusieurs de ses articles sur le sujet (Beltrami et al. 2003; Oransky and Marcus 2018). En supposant qu'aucune rétraction de leurs articles ne sera nécessaire, les cellules souches cardiaques ont été isolées pour la première fois en 2003 (Beltrami et al. 2003). Ce groupe a été le premier à contredire la croyance selon laquelle le cœur n'avait aucune capacité d'auto-régénération. Ces cellules ont été observées chez les rongeurs et les humains, se trouvent en grappes à la fois dans les parois ventriculaires et auriculaires, et sont réparties entre des cardiomyocytes matures (Beltrami et al. 2003). Il est ainsi pertinent d'attendre le dénouement de ce débat avant d'élaborer davantage sur les cellules souches cardiaques.

Cellules souches pluripotentes induites – iPSCs

Pour revenir à ce qui a été mentionné dans une section précédente concernant le Dr. Yamanaka, il a reçu le prix Nobel pour sa démonstration de la possibilité de reprogrammer des cellules souches en introduisant quatre facteurs: Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4. Comme mentionné

précédemment, jusqu'à sa publication en 2006, nous pensions que les cellules différenciées ne pouvaient être reprogrammées qu'en transférant les noyaux dans des ovocytes. C'est également lui qui introduit le terme « cellules souches pluripotentes induites » pour désigner ces cellules reprogrammées. La livraison de ces facteurs a été effectuée par transduction de rétrovirus dans des cellules de souris adultes et le test de pluripotence a été réalisé par injections sous-cutanées chez des souris nues et dans des blastocystes (Takahashi and Yamanaka 2006). Suivant l'injection, les iPSC sous-cutanées sont devenues des tumeurs contenant des cellules des trois types de feuillet germinale, tandis que les iPSCs dans les blastocystes ont contribué au développement de l'embryon (Takahashi and Yamanaka 2006). L'année suivante, le même groupe était également capable de produire des iPSCs dérivées de cellules humaines en utilisant les mêmes quatre facteurs (Takahashi et al. 2007). La communauté scientifique a reçu cette découverte avec beaucoup d'enthousiasme, justifiant le prix Nobel en 2012. Une des raisons principales était la possibilité de dériver des cellules souches directement à partir de patients avant que ceux-ci ne subissent un traitement à base de cellules souches et, par le fait même, ignorer l'éventuel rejet des cellules transplantées. Depuis, l'oncogène Myc a été omis et des améliorations ont permis d'éliminer l'utilisation de rétrovirus, éliminant ainsi le risque de dysfonctionnement génétique imprévisible lié à l'intégration de vecteur viral (Kaji et al. 2009). Il reste encore beaucoup de recherches à effectuer sur les iPSC pour répondre à des questions persistantes, telles que l'étendue de leur pluripotence.

Cellules souches embryonnaires

Comme le présent chapitre vise à introduire les connaissances de base sur les cellules souches, la présente sous-section couvrira autant les cellules souches embryonnaires humaines que celles de souris. Quoique la majorité du travail effectué lors de la maîtrise fût avec des cellules souches embryonnaires de souris, un objectif futur du laboratoire est d'utiliser des cellules humaines. Ainsi, les différences et similitudes entre les deux seront présentées ici-bas, suivies par un survol des méthodes de culture se rapportant aux cellules souches embryonnaires et leur différenciation en cardiomyocytes.

Cellules souches embryonnaires humaines versus souris

De toute évidence, les souris et les humains sont différents à bien des égards. Cela se manifeste non seulement physiquement, mais également au niveau cellulaire, ce qui inclut des différences de morphologie, d'expression de marqueur de différenciation, de cycle cellulaire, de profils d'expression de cytokines et de gènes régulateurs de l'apoptose (Ginis et al. 2004; Schnerch, Cerdan, and Bhatia 2010). Bien que des chimères inter-espèces aient récemment été rapportées (Mascetti and Pedersen 2016), prouvant la pluripotence *in vivo* des hESCs et des hiPSCs, il existe des différences d'espèces considérables, que cette section tentera de décrire. Il a été mentionné précédemment que l'isolement des lignées ESC de souris remonte à 1981 (Martin 1981), alors que ce n'est qu'en 1998 que Thompson a isolé la première lignée ESC humaine (Thomson et al. 1998). C'était en partie dû au manque de milieu de culture approprié pour les embryons humains à l'époque et aux différences entre les espèces (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). D'autre part, beaucoup a été appris des ESCs de souris, non seulement avant l'arrivée des hESCs, mais depuis aussi (Ginis et al. 2004), incluant les méthodes de propagation de lignées cellulaires, les dépendances de facteurs de croissance et l'expression de marqueurs. Il est à noter que toutes ces connaissances n'ont pas été directement applicables aux ESC humaines, mais que certaines modifications étaient nécessaires. Les paragraphes suivants tenteront de souligner les principales différences et similitudes entre les deux types de cellules. Premièrement, comparons la morphologie des ESCs des deux espèces. Lorsqu'elles sont examinées au microscope électronique et cultivées sur une couche nourricière, les cellules humaines non différenciées forment une couche de 2 à 4 cellules tandis que les cellules de souris forment généralement des agrégats avec de 4 à 10 cellules de hauteur (Ginis et al. 2004). De nombreux laboratoires ont également remarqué que les hESCs forment des colonies rondes aux contours bien définis, alors que ce n'est pas le cas pour les mESCs. Ces dernières, tout en restant quelque peu arrondies, présentent généralement une morphologie plus diverse. De plus, les colonies de mESCs possèdent de nombreuses cellules apoptotiques, en particulier plus près des bords, et des autophagosomes dans presque une cellule sur quatre, alors que ce n'est pas le cas avec les ESC humaines (Ginis et al. 2004). D'autre part, les deux ont montré un rapport noyau sur cytoplasme élevé, un grand nombre de ribosomes et des structures polarisées. Ginis *et al.* ont signalé la présence de jonctions serrées et de jonctions *gap* chez les deux espèces de ESC,

avec leur nombre de plus en plus important en se rapprochant de la surface. Ils ont aussi confirmé cette revendication par immunomarquage à la connexine 43, qui était clairement apparente. De plus, les hESCs supportent mal la dissociation enzymatique en cellules individuelles, contrairement à leurs homologues de souris (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). Il a été montré que des voies de signalisation spéciales pouvaient être manipulées, telles que l'inhibition de la voie de la kinase associée à Rho, afin de diminuer l'apoptose induite par la dissociation (Watanabe et al. 2007).

Les voies de signalisation jouent un rôle clé dans le renouvellement cellulaire, la pluripotence et le devenir des cellules souches. Une revue complète de ces mécanismes va bien au-delà de la portée du présent document et de la compétence de son auteur. Les identités des deux lignes de ESC sont essentiellement gérées par des réseaux de signalisation distincts. Les hESCs sont maintenues indifférenciées par les médiateurs centraux des voies FGF et IGF, tandis que la voie LIF/Stat3 est nécessaire pour que les mESCs restent non différenciées (Schnerch, Cerdan, and Bhatia 2010). Fait intéressant, Sato *et al.* ont démontré que l'activation de la voie canonique Wnt est suffisante pour maintenir l'auto-renouvellement des deux lignées cellulaires (Sato et al. 2004). De plus, plusieurs autres voies de signalisation sont importantes pour les cellules souches embryonnaires, notamment les gènes hétérochroniques, les microARN, les gènes impliqués dans la régulation télomérique et les répresseurs polycomb (Rao 2004).

Il a été mentionné précédemment que les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog doivent être exprimés dans toute cellule mammifère afin de pouvoir la déclarer comme pluripotente. Bien qu'ils puissent être trouvés à la fois chez les ESCs de souris et d'humain, la modulation de ces facteurs peut avoir un impact différent sur les cellules tandis que leur expression est dépendante de l'espèce. Par exemple, chez les hESCs, une légère augmentation d'oct4 favorise uniquement la différenciation de l'endoderme, alors qu'elle provoque une différenciation spontanée vers le type de cellules mésoderme/endoderme pour les mESCs (Niwa, Miyazaki, and Smith 2000; Rodriguez et al. 2007). Également, une expression réduite chez les hESCs favorise une régulation positive des marqueurs démontrant la différenciation mésoderme/endoderme (Rodriguez et al. 2007), tout en provoquant une différenciation en trophoctoderme pour les deux espèces (Schnerch, Cerdan, and Bhatia 2010).

Enfin, la raison pour laquelle nous avons choisi les mESCs plutôt que hESCs était axée sur les aspects réglementaires et financiers, ainsi que sur l'expertise. D'un côté, les mESCs sont

beaucoup plus simples à acquérir et un peu plus faciles à cultiver, étant donné la possibilité d'utiliser le facteur inhibiteur de la leucémie (*Leukemia inhibitory factor* – LIF) pour maintenir les cellules non différenciées. D'autre part, d'autres laboratoires de l'Institut de Cardiologie de Montréal possédaient déjà une expertise avec une certaine lignée de mESC et souhaitaient non seulement partager cette expertise avec notre laboratoire, mais aussi fournir les cellules gratuitement. Le consensus est alors le suivant: nous allons d'abord acquérir l'expertise pratique avec les ESC dans le domaine de la culture avec les mESC, tester nos différentes hypothèses en les utilisant et, dans un proche avenir, le laboratoire effectuera la transition vers les hESCs. Cette expertise acquise rendra également les demandes réglementaires et financières plus susceptibles d'obtenir des réponses positives.

Dérivation des cellules souches embryonnaires

Comme mentionné précédemment, la première lignée humaine de ESCs a été dérivée par Thompson *et al.* en 1998 (Thomson et al. 1998). Depuis, de nombreuses nouvelles lignées de cellules souches ont été produites, atteignant plus de 400 en janvier 2006 (Guhr et al. 2006) et plus de 1000 en 2009, bien que toutes ces lignées cellulaires n'aient pas été caractérisées parfaitement (Löser et al. 2010). La plupart des lignées de ESC disponibles sont enregistrées et peuvent être trouvées soit sur le site Web du Forum international des cellules souches (ISCF), celui du nibsc (UK Stem Cell Bank (UKSCB)), sur le site Web du National Institute of Health (NIH) ou sur le site de l'UE hESCreg. La sous-section suivante décrira un aperçu des techniques de dérivation utilisées afin d'obtenir de nouvelles lignées de cellules souches embryonnaires.

Comme ce fut le cas pour Thompson *et al.*, la plupart des lignées de hESC sont dérivées d'embryons excédentaires donnés, obtenus par fécondation in vitro (Thomson et al. 1998; Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). La technique présentée ci-dessous fonctionne peu importe que les embryons soient frais ou congelés. De plus, il a été rapporté et il est logique que les embryons de qualité supérieure conduisent à des taux de réussite plus élevés lors de la génération de lignée de ESC (Lerou et al. 2008). Une fois les embryons dans des boîtes de culture (*petri dish*), la première étape est de retirer la zone pellucide. Cette étape peut être réalisée à l'aide de différentes méthodes: pronase, solution d'acide de Tyrode ou dissection mécanique (Unger et al. 2008). L'étape suivante consiste à isoler l'ICM des cellules throphoectodermes résidantes, en utilisant l'isolation mécanique ou l'immunochirurgie. Cette dernière consiste à traiter le

blastocyste avec un anticorps de souris dirigé contre les cellules du throphoectoderme et les composants du complément du cobaye (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). La méthode à utiliser doit être liée à la qualité de l'embryon et, de préférence, aux bonnes pratiques de fabrication (BPF), ce qui signifie que la méthode utilisée est constante dans sa production et qu'elle minimise les risques encourus. Par exemple, il y a dix ans, la plupart des lignées étaient dérivées à l'aide de la pronase et de l'immunochirurgie. Cependant, cette méthode peut entraîner la perte de l'ICM pour les blastocystes présentant des ICM plus petites ou indistinctes (H. S. Kim et al. 2005). De plus, cette méthode implique des substances d'origine animale, et donc un risque de contamination par des agents pathogènes animaux et n'est pas souhaitable dans les systèmes de culture sans xéno pour la transplantation de cellules souches (liée aux BPF) (H. S. Kim et al. 2005; Unger et al. 2008). L'ouverture et l'isolement à l'acide de Tyrode ou la dissection mécanique seraient préférables car il n'y a ainsi aucun contact entre les ESCs et les substances dérivées d'animaux (Unger et al. 2008). Face à des ICM sans zone pelliculée distincte, des méthodes de culture pour embryon entier ou embryon partiel pourraient être utilisées. Il a été observé que les techniques pour embryon entier ont des problèmes d'expansion de la masse cellulaire interne résultant d'une prolifération trophoctodermique (H. S. Kim et al. 2005). Dans la méthode des embryons partiels, l'utilisation d'une pipette en verre ultrafin pour isoler chirurgicalement l'ICM résout ce problème de prolifération. Heins *et al.* ont également signalé la possibilité de traiter des blastocystes éclos spontanément sans qu'il soit nécessaire de retirer la zone pellucide (Heins et al. 2004).

Une fois l'ICM isolée, les cellules sont cultivées sur une couche nourricière inactivée mitotiquement composée de fibroblastes de souris (généralement) ou d'humains (Amit et al. 2003). Après 1 à 2 semaines, les cellules ont suffisamment crû pour être disséquées, généralement à l'aide d'un microscope, puis transférées dans de nouvelles boîtes de culture en vue d'une expansion supplémentaire (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). En fonction de différents paramètres de culture tels que le temps de dédoublement et la méthode de culture, les cellules sont passées tous les 5 à 10 jours. Une manipulation et une surveillance minutieuse des cellules sont cruciales car la viabilité de la ICM obtenue est fragile. Le taux de réussite escompté est supérieur à 5%, mais comme mentionné précédemment, il est directement lié à la qualité de l'embryon (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016).

Amplification des cellules souches embryonnaires

Contrairement aux cellules souches embryonnaires de souris, l'amplification des hESCs n'est pas aussi simple que d'utiliser un milieu de culture contenant du LIF. Cette sous-section passe en revue les différentes méthodes de culture pour la propagation des hESCs. En bref, les mESCs peuvent être cultivées de la même manière que les hESCs sur une couche d'alimentation en fibroblastes ou sur une simple boîte de culture recouverte de gélatine avec du LIF dans le milieu de culture. Cette technique est utilisée pour la phase d'amplification lors du travail avec les mESCs au courant de ma maîtrise.

Deux aspects clés de l'amplification des ESCs présentent des variantes et seront décrits ci-dessous. Le premier aspect majeur est le milieu de culture, tandis que le second est la surface sur laquelle les cellules se propagent. Commençons par couvrir le milieu de culture. Initialement, le premier milieu de culture contenait du sérum de veau fœtal (FBS) (Thomson et al. 1998). Quelques années plus tard, le sérum humain a commencé à être utilisé pour éliminer le risque de transfert d'agents pathogènes d'origine animale vers les hESCs, afin de permettre un usage clinique (Richards et al. 2002). Finalement, les sérums étant des mélanges complexes avec des composés incertains et variant en concentration, certains groupes ont commencé à travailler sur une culture sans sérum, en utilisant des composés définis. Un exemple de cette culture sans sérum est l'utilisation du substitut de sérum Knockout (Ko-SR), qui est maintenant un substitut de sérum conventionnel contenant un facteur de croissance de base des fibroblastes (Unger et al. 2008). Cependant, il contient également de l'AlbuMAX, qui est une fraction d'albumine riche en lipides de sérum bovin et de transferrine bovine (Unger et al. 2008), ce qui ramène les mêmes risques que ceux décrits précédemment pour l'utilisation de composants non humains. Comme nous le savons maintenant, certains facteurs sont nécessaires pour que les cellules se renouvellent elles-mêmes en permanence et pour qu'elles conservent leur pluripotence. La méthode de culture classique consiste à utiliser une couche nourricière sur laquelle les ESCs sont cultivées. Cette couche nourricière est généralement constituée de fibroblastes inactivés mitotiquement. Celle-ci fournit non seulement le conditionnement du milieu requis, mais également un support cellulaire, le dépôt de composants de matrice extracellulaire et les interactions cellule à cellule requises par les ESCs (Thomson et al. 1998; Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). Un préconditionnement du milieu en utilisant des cellules

nourricières est également possible, bien que certains groupes aient même signalé l'utilisation de conditions de culture sans couche nourricière ou préconditionnement en utilisant du Ko-SR en plus d'autres facteurs, notamment l'activine A (Xiao, Yuan, and Sharkis 2006). La surface sur laquelle les cellules sont cultivées doit être adhérente, comme le serait un plat de culture recouvert de gélatine. En résumé, le milieu de culture et/ou la surface de culture utilisés devraient fournir tous les nutriments et facteurs permettant aux ESCs de se renouveler et de rester dans un état indifférencié, tandis que la surface de culture devrait fournir le support structurel aux cellules.

Les exigences en matière de passage des cellules sont souvent déterminées de manière empirique. Habituellement, le passage des hESCs s'effectue aux 5 à 7 jours (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). À l'origine, la méthode de propagation des hESCs était la dissection mécanique. Un outil de coupe pointu et fin, tel qu'un capillaire étiré au-dessus d'une flamme ou un micro scalpel, est utilisé pour diviser la colonie en petites fractions qui sont ensuite transférées sur une nouvelle couche nourricière (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). Cette méthode manuelle est très laborieuse et nécessite beaucoup de pratique en micro dissection. Il serait également impensable d'utiliser cette méthode pour la production à grande échelle de ESCs. Une autre méthode de passage possible est le passage par enzyme. En bref, la dissociation est réalisée par des enzymes telles que la trypsine et la collagénase IV et/ou par un traitement à l'EDTA (Gaskell, Englund, and Hyllner 2016). Bien entendu, comme les cellules humaines supportent mal d'être suspendues individuellement, la dissociation enzymatique apporte elle aussi certaines complications. Il est important de ne pas ensemer les cellules souches embryonnaires à trop faible densité ou de les laisser atteindre un état trop confluent, car dans chacun des cas elles commenceront à se différencier spontanément. Ceci est démontré par l'apparition de structures 3D aléatoires, la migration de cellules ressemblant à des fibroblastes, la détérioration de la couche nourricière et une modification de la couleur du milieu due à l'acidification dans des cultures hautement confluentes. Dans certains cas extrêmes, on peut observer la formation de cellules qui battent spontanément et des excroissances de type neural.

Différenciation des cellules souches embryonnaires vers un phénotype cardiomyocyte

Aujourd'hui, il est possible de différencier efficacement les iPSCs, ESCs et autres cellules souches pluripotentes humaines en cardiomyocytes fonctionnels et le nombre de protocoles qui dérivent ces cardiomyocytes a augmenté de manière exponentielle au cours de la dernière décennie (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). La dérivation humaine sera traitée dans cette section, bien que dans le cadre du projet de maîtrise les mESCs ont été utilisées pour obtenir des cardiomyocytes (CMs). Le raisonnement de cette approche est similaire à ce qui a été mentionné au début de ce chapitre. Ayant déjà trouvé un protocole de différenciation « simple » (Kokkinopoulos et al. 2016), il est important de comprendre la dérivation des cellules souches humaines, qui sera éventuellement la priorité de notre laboratoire. Cela permettra de mieux comprendre les méthodes de culture et ses limites lors du passage des mESCs aux hESCs, ainsi que de choisir un protocole optimal. En outre, les principales étapes du développement cardiaque sont conservées entre l'homme et les autres mammifères, de sorte que la plupart des informations ci-dessous peuvent être transférables à la différenciation des cellules de souris.

Dans la littérature, il est clair que les facteurs de transcription Tbx5, Hey2, Irx4 et COUP-TFII sont responsables du contrôle de nombreux gènes auriculaires et ventriculaires qui établissent l'identité auriculaire ou ventriculaire (Wu et al. 2013). Les premiers signaux nécessaires afin de générer des cellules de type mésoderme sont les protéines nodales, les protéines bonemorphogenetic (BMP), celles Wnts et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). Par la suite, une inhibition de la voie Wnt/ β -caténine par Dickkopf-1 (Dkk-1) est requise pour la spécification cardiaque (Prowse et al. 2014).

La différenciation des cardiomyocytes se fait actuellement selon quatre approches principales: la formation de corps embryonnaire, la co-culture, la monocouche adhérente et la suspension dynamique. Cette dernière est actuellement le seul système de culture à grande échelle, tandis que les trois autres sont utilisés pour générer des cardiomyocytes humains à petite échelle (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). Comme le projet de maîtrise visait une culture à petite échelle, la suspension dynamique ne sera pas abordée dans cet ouvrage.

Les corps embryonnaires (*Embryonic Bodies* - EB) sont des agrégats ronds 3D résultant de la culture de cellules souches pluripotentes dans un milieu qui ne maintient pas leur pluripotence.

Après agrégation, ces cellules se différencient de manière stochastique en cellules des trois couches germinales, ce qui signifie que les cellules se différencient de manière aléatoire (Itskovitz-Eldor et al. 2000). La différenciation spontanée en cardiomyocytes qui battent est attendue des corps embryonnaires puisque les cardiomyocytes sont l'un des premiers types cellulaires induits des EBs dans lesquels les interactions entre cellules stimulent l'expression de marqueurs pour les lignées cellulaires cardiaques précoces et mésodermiques (Tran et al. 2009). Comme mentionné précédemment, les hESCs ne soutiennent pas naturellement la dissociation monocellulaire. C'est pourquoi initialement la culture de EB a été réalisée en traitant d'abord les colonies de hESCs avec la collagénase IV, puis en cultivant en suspension les agrégats de cellules (Kehat et al. 2001). Suivant les travaux de Kehat *et al.*, 20 jours après avoir étalé les corps embryonnaires dans des plats de culture, ils ont observé des zones de battement spontané dans seulement 8,1% des EB, démontrant un besoin d'optimisation de protocole (Kehat et al. 2001). En ce qui concerne l'amplification, le milieu initial contenait du FBS et une concentration sous-optimale d'autres réactifs. Au cours des années suivantes, de nombreux groupes de recherche ont proposé des protocoles plus optimisés, introduisant de l'acide ascorbique dans le milieu contenant du FBS et finissant par abandonner le FBS pour un milieu sans sérum plus défini (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). L'acide ascorbique, le BMP4, le bFGF, l'activine A, le VEGF et le DKK1 (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016) comptent parmi les facteurs importants composant les milieux de différenciation utilisés de manière séquentielle. Ces dernières années, il a été démontré que le remplacement du sérum par un milieu défini contenant une concentration connue de facteurs de croissance améliore considérablement l'efficacité de différenciation des EBs et réduit également le risque potentiel de contamination par des agents pathogènes liés au sérum. Pour le démontrer, Karakikes *et al.* ont proposé un protocole aboutissant à des corps embryonnaires présentant presque 100% de battement et grossièrement 90% des cellules étaient cTnT et α -actinine positives (Karakikes et al. 2014).

La taille et la morphologie des EB influencent de manière endogène sur la différenciation spécifique au type de cellule. Bien que la technique de culture en goutte suspendue (*hanging drop technique*) pour la formation des EB augmente l'uniformité de ceux-ci et qu'elle soit fréquemment utilisée pour les mESCs, elle est moins utilisée pour les hESCs (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). Pour générer des EB uniformes, les techniques suivantes ont été utilisées dans les laboratoires du monde entier: la technique en goutte suspendue, par

agrégation forcée (Burridge et al. 2007), surfaces de micro-puits en agarose-DMEM façonnées (*patterned agarose-DMEM microwell surfaces*) (Dahlmann et al. 2013), technique d'impression par microcontact (Mohr et al. 2010) et la technologie de micro encapsulation (Jing, Parikh, and Tzanakakis 2010). Bien que la différenciation basée sur les corps embryonnaires présente encore de nombreux inconvénients, elle reste la principale méthode de génération de cardiomyocytes humains (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016).

La méthode de différenciation basée sur la co-culture repose sur l'imitation du développement embryonnaire précoce au cours duquel l'endoderme antérieur est situé directement en arrière du croissant cardiaque embryonnaire. En fournissant des signaux inductifs et inhibiteurs, l'endoderme antérieur est considéré comme essentiel pour la cardiogenèse (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). En utilisant ces connaissances, Mummery *et al.* ont découvert que la coculture de cellules END-2 mitotiquement inactivées avec des hESCs entraînait la formation de zones de contractions spontanées dans leurs cultures de hESCs (Mummery 2003). Cependant, seule une très petite fraction des cellules étaient des cardiomyocytes. Depuis, les milieux et les protocoles ont été optimisés et de meilleurs rendements en cardiomyocytes ont été rapportés avec cette technique (X. Q. Xu et al. 2008). Bref, la co-culture est fiable pour générer des cardiomyocytes, même si la technique par corps embryonnaires standard n'était pas efficace avec certaines lignées de hESCs. Cependant, cette technique prend beaucoup de temps et de travail manuel (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016).

La première différenciation de hESCs en CMs par la culture en monocouche adhérente a été réalisée en 2007 et, comme pour la plupart des nouveaux protocoles, avait une efficacité de différenciation limitée de cardiomyocytes (~ 30%) (Laflamme et al. 2007). Ils ont ensuite montré qu'en ajustant certains paramètres de culture, tels que la densité d'ensemencement, l'intervalle de passage et l'induction d'activine A, toutes les lignées de cellules souches embryonnaires humaines pouvaient être différenciées à l'aide de leur protocole, en plus d'augmenter le rendement en cardiomyocytes (Zhu, Van Biber, and Laflamme 2011). Différents milieux de culture ont été utilisés pour diriger la différenciation des cardiomyocytes, dont certains ont d'abord été optimisés à l'aide de la technique par corps embryonnaires (Laflamme et al. 2007). Des modifications et améliorations supplémentaires ont été ajoutées à la méthode de culture initiale pour laquelle l'introduction de petites molécules a été utilisée pour manipuler les voies de signalisation de la différenciation. Ceci a conduit au développement de protocoles

sans facteur de croissance, qui ont démontré une efficacité et une homogénéité accrues (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). Pour des informations plus détaillées sur les différents supports utilisés dans l'une ou l'autre des techniques décrites ci-dessus, le lecteur est invité à consulter l'analyse de Talkhabi sur le sujet (Talkhabi, Aghdami, and Baharvand 2016). De plus, ThermoFisher Scientific vend maintenant un kit en trois étapes (milieux séquentiels) pour différencier les hESCs en cardiomyocytes (A2921201, ThermoFisher). Cette technique présente des similitudes avec le protocole du Dr. Kokkinopoulos utilisé lors de la maîtrise.

Méthodes - Culture cellulaire

À partir des connaissances présentées dans les sous-sections précédentes et en se basant sur le guide de culture de Millipore (EMD Millipore 2018) et les travaux du Docteur Kokkinopoulos (Kokkinopoulos et al. 2016), une méthodologie a été développée pour la culture des cellules souches embryonnaires de souris et leur différenciation en cellules cardiaques. La présente sous-section décrit cette méthodologie qui fut utilisée durant le projet de maîtrise.

Revêtement des boîtes de culture avec une solution de gélatine

La première étape avant de débiter la culture et avant chaque passage cellulaire consiste à recouvrir la surface de culture de gélatine, que ce soit les bassins de PDMS créés durant le projet ou des pétris conventionnels. Pour ce faire, les étapes suivantes furent réalisées:

1. Avant son utilisation, réchauffer à température pièce la solution de gélatine 0.1% (ES-006-B, Millipore).
2. Sous la hotte de culture, dans des conditions stériles, ajouter la solution à chaque bassins (ou pétris) afin de recouvrir leur fond complètement.
3. Laisser reposer les bassins (ou pétris) durant au moins 30 minutes sous la hotte.
4. Aspirer et jeter la solution de gélatine immédiatement avant d'ajouter les cellules et leur milieu. Note : Faire bien attention de ne pas laisser la solution sécher dans le fond.

Amplification Cellulaire avec couche nourricière

Il est possible de cultiver les cellules souches embryonnaires de souris selon deux méthodes. La première consiste à l'utilisation d'une couche nourricière en fibroblastes (*Primary Mouse Embryo Fibroblasts* - PMEF), et fut principalement utilisé au début de la culture cellulaire puisque précédemment utilisée par nos collaborateurs. Les méthodes suivantes furent exécutées dans des conditions stériles du début de la culture jusqu'au 4e passage :

1. Enduire les pétris de gélatine 0.1%.
2. Préparer au besoin le milieu pour les PMEF : EmbryoMax DMEM, 10% de FBS, 1% de Pen-Strep et 1% de solution de L-Glutamine.
3. Décongeler rapidement un tube de PMEF dans un bain-marie à 37 ° C et transférer les cellules dans un tube de 15 mL (contenant déjà 10 mL de milieu cellulaire de PMEF chaud). Retourner doucement le tube afin de mélanger et centrifuger à 300G pendant 5 minutes.
4. Aspirer le surnageant et remettre en suspension les cellules avec du milieu cellulaire PMEF chaud.
5. Aspirer la gélatine des pétris et ensemercer les fibroblastes (2.8×10^6 cellules pour un pétris de 100 mm de diamètre).
6. Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂ durant 24h.
7. Préparer au besoin le milieu pour les mESCs : EmbryoMax DMEM, 10% de FBS, 1% de Pen-Strep, 1% de solution de L-Glutamine, 1% de nucléosides (100X), 1% d'acides aminés non essentiels (100x), 1% de 2-mercaptoéthanol (100x) et 1000 unités/mL mLIF.
8. Décongeler rapidement un tube contenant 3×10^6 cellules souches embryonnaires dans un bain-marie à 37 ° C et transférer dans 4 mL de milieu mESC et 4 mL de FBS. Centrifuger 5 minutes et remettre en suspension les cellules dans 10 mL de milieu de cellules ES.
9. Enlever le milieu PMEF et ensemercer les cellules souches (3×10^6 cellules pour un pétris de 100mm de diamètre). Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂.
10. Examiner à tous les jours les cultures et s'assurer que le milieu ne doit pas être changé (indiqué par un changement de couleur jaune) ou que les cellules ne dépassent pas 85% de confluence à aucun endroit dans le pétris.

11. Pour passer les mESCs, préparez deux pétris contenant des cellules PMEF comme décrit précédemment. Retirer le milieu cellulaire ES, rincer les plaques deux fois avec du DPBS et ajouter 1,2 mL de trypsine (pour pétris de 100mm de diamètre). Incuber à 37 ° C pendant 2 minutes. Ajouter 10 ml de milieu mESCs et pipeter vigoureusement pour disperser les agrégats de cellules (éviter la formation de bulles).
12. Compter les cellules à l'aide d'un hématimètre. Une fois le milieu PMEF des nouveaux pétris aspiré, ensemercer les mESCs (3×10^6 cellules pour un pétris de 100mm de diamètre). Les cellules restantes peuvent être congelées.

Amplification cellulaire sans couche nourricière

La deuxième méthode de culture des mESCs utilisée est semblable à celle décrite ci-haut, à la différence qu'aucune couche nourricière n'est utilisée. La technique à choisir dépend de la ligné utilisée. Cette technique fut utilisée dans des conditions stériles pour le reste de la culture des mESCs à partir du 5^e passage :

1. Enduire les pétris de gélatine 0.1%.
2. Préparer au besoin le milieu pour les mESCs : EmbryoMax DMEM, 10% de FBS, 1% de Pen-Strep, 1% de solution de L-Glutamine, 1% de nucléosides (100X), 1% d'acides aminés non essentiels (100x), 1% de 2-mercaptoéthanol (100x) et 1000 unités/mL mLIF.
3. Décongeler rapidement un tube contenant 3×10^6 cellules souches embryonnaires dans un bain-marie à 37 ° C et transférer dans 4 mL de milieu mESC et 4 mL de FBS. Centrifuger 5 minutes et remettre en suspension les cellules dans 10 mL de milieu de cellules ES.
4. Aspirer la solution gélatine et ensemercer les cellules souches (3×10^6 cellules pour un pétris de 100mm de diamètre). Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂.
5. Examiner à tous les jours les cultures et s'assurer que le milieu ne doit pas être changé (indiqué par un changement de couleur jaune) ou que les cellules ne dépassent pas 85% de confluence à aucun endroit dans le pétris.
6. Pour passer les mESCs, préparez deux pétris contenant de la solution de gélatine. Retirer le milieu cellulaire ES, rincer les plaques deux fois avec du DPBS et ajouter 1,2 mL de

trypsine (pour des pétris de 100mm de diamètre). Incuber à 37 ° C pendant 2 minutes. Ajouter 10 ml de milieu mESCs et pipeter vigoureusement pour disperser les agrégats de cellules (éviter la formation de bulles).

7. Compter les cellules à l'aide d'un hématimètre. Une fois la solution de gélatine des nouveaux pétris aspirée, ensemer les mESCs (3×10^6 cellules pour un pétris de 100mm de diamètre). Les cellules restantes peuvent être congelées.

Congélation des cellules

Pour ne pas gaspiller de cellules et surtout pour pouvoir les utiliser sur une grande période de temps, à chaque passage cellulaire des cellules peuvent être congelées. Pour ce faire, lorsqu'elles sont en suspension dans le milieu mESCs, les étapes suivantes doivent être exécutées dans des conditions stériles :

1. Compter les cellules au besoin et centrifuger 5 minutes. Remettre en suspension les cellules dans du milieu contenant 50% de milieu mESCS et 50% de milieu de congélation EmbryoMax (REF) froid, afin d'obtenir une concentration de 3×10^6 cellules/mL.
2. Répartir les cellules en aliquotes de 1 mL dans des tubes d'au moins 1.5 mL.
3. Rapidement, transférer les tubes dans un *Mr. Frosty* (5100-0001, ThermoFisher) gardé à 4 °C.
4. Placer le *Mr. Frosty* dans le congélateur à -80°C durant 24h et par la suite transférer les tubes dans un contenant d'azote liquide.

Différentiation en cardiomyocytes

L'approche utilisée pour la différenciation des cellules souches en cardiomyocytes fut par monocouche adhérente. Le protocole utilisé lors de projet est dérivé du protocole du Dr. Kokkinopoulos (Kokkinopoulos et al. 2016), consistant en l'utilisation de trois milieux successifs. Les étapes suivantes présentes les grandes lignes de la méthodologie utilisée pour la différenciation :

1. Revêtir un pétri avec de la gélatine 0.1% selon la méthode précédemment décrite.

2. Préparer au besoin le milieu pour les mESCs : EmbryoMax DMEM, 10% de FBS, 1% de Pen-Strep, 1% de solution de L-Glutamine, 1% de nucléosides (100X), 1% d'acides aminés non essentiels (100x), 1% de 2-mercaptoéthanol (100x) et 1000 unités/mL mLIF.
3. Décongeler rapidement un tube contenant 3×10^6 cellules souches embryonnaires de souris dans un bain-marie à 37°C et transférer dans 4 mL de milieu mESC et 4 mL de FBS. Centrifuger 5 minutes et remettre en suspension les cellules dans 10 mL de milieu mESCs.
4. Aspirer la solution gélatine et ensemer les cellules souches. Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂.
5. Examiner à tous les jours les cultures et s'assurer que le milieu ne doit pas être changé (indiqué par un changement de couleur jaune) ou que les cellules ne dépassent pas 85% de confluence à aucun endroit dans le pétris.
6. Une fois une confluence proche de 85% atteinte, préparer les pétris et/ou bassins avec de la solution de gélatine. Retirer le milieu cellulaire ES, rincer les plaques deux fois avec du DPBS et ajouter 1,2 mL de trypsine (pour des pétris de 100mm de diamètre). Incuber à 37 ° C pendant 2 minutes. Ajouter 10 ml de milieu mESCs et pipeter vigoureusement pour disperser les agrégats de cellules (éviter la formation de bulles).
7. Compter les cellules à l'aide d'un hématimètre. Une fois la solution de gélatine des nouveaux pétris et/ou bassins aspirée, ensemer les mESCs (environ 70 000 cellules par bassins de PDMS et pétris avec fond de 1cm de diamètre). Rajouter au besoin du milieu mESC afin que les cultures ne s'assèchent pas une fois dans l'incubateur. Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂ durant 8 heures.
8. Préparer au besoin la solution de différenciation #1 : IMDM/Ham's F12 (12440053/11765054, ThermoFisher), 0,5 % de supplément N2 (17502048, ThermoFisher), 1% de supplément B27 (17504044, ThermoFisher), 10% d'albumine de sérum bovin (BSA) (A1595, Sigma), 1% de L-glutamine (25030081, ThermoFisher), 1% de Pen-Strep (TMSAB2C, ThermoFisher), 0,5 mM d'acide ascorbique (A92902, Sigma) et $4,5 \times 10^{-4}$ M de Monothylglycérole (M6145, Sigma).
9. Aspirer doucement le milieu mESC et rincer deux fois au DPBS les bassins et/ou pétris contenant les cellules souches. Ajouter environ 1 mL de milieu de différenciation #1 par

pétris et/ou remplir les bassins de PDMS avec la même solution. Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂ durant 24 heures.

10. Préparer au besoin la solution de différenciation #2 : IMDM/Ham's F12 (12440053/11765054, ThermoFisher), 0,5 % de supplément N2 (17502048, ThermoFisher), 1% de supplément B27 (17504044, ThermoFisher), 10% d'albumine de sérum bovin (BSA) (A1595, Sigma), 1% de L-glutamine (25030081, ThermoFisher), 1% de Pen-Strep (TMSAB2C, ThermoFisher), 0,5 mM d'acide ascorbique (A92902, Sigma), $4,5 \times 10^{-4}$ M de Monothioglycérole (M6145, Sigma), 8ng/mL d'activine A (338-AC, R&D Systems), 0,5 ng/mL de BMP4 (314-BP, R&D Systems) et 5ng/mL de hVEGF (293-VE, R&D Systems).
11. Aspirer doucement le milieu de différenciation #1 et rincer deux fois au DPBS les bassins et/ou pétris. Ajouter environ 1mL de milieu de différenciation #2 par pétris et/ou remplir les bassins de PDMS avec la même solution. Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂ durant 48 heures.
12. Préparer au besoin la solution de différenciation #3 : Milieu Stem Pro-34 SF (10639011, ThermoFisher), 1% L-glutamine, 0,5mM d'acide ascorbique, 5 ng/mL de hVEGF, 10ng/mL de hbFGF (233-FB, R&D Systems) et 50 ng/mL de hFGF10 (345-FG, R&D Systems).
13. Aspirer doucement le milieu de différenciation #2 et rincer deux fois au DPBS les bassins et/ou pétris. Ajouter environ 1,5 mL de milieu de différenciation #1 par pétris et/ou remplir les bassins de PDMS avec la même solution. Incuber les cellules à 37 °C et 5% de CO₂.
14. Examiner à tous les jours les cultures et s'assurer que le milieu ne doit pas être changé (indiqué par un changement de couleur jaune). Les bassins requièrent d'avoir leur milieu changé optimalement à chaque jour, tandis que les pétris, qui contiennent plus de milieu, peuvent être changés aux deux jours.

Note : Pour les cellules souches ayant été cultivées sur une couche nourricière, passer les cellules quelques fois en utilisant des pétris avec gélatine seulement afin de réduire le nombre de fibroblastes. Pour la même raison, il est également recommandé d'ensemencer

et passer les cellules rapidement, leur laissant 15 minutes pour adhérer à la gélatine et n'utilisant pas de trypsine, environs trois ou quatre fois avant de débiter la différenciation

Résultats – Culture cellulaire

Cellules utilisées

Les cellules qui ont servi au cours du projet ont été données par nos collaborateurs du laboratoire de John Rioux à l'Institut de Cardiologie de Montréal. À leur réception, les cellules étaient congelées et du nombre de 3×10^6 cellules. La lignée cellulaire utilisée, E14TG2A, provient d'un blastocyste de souris et de la souche 129/Ola (ATCC). Elle est dérivée des lignées cellulaires produites par Hooper en 1987 (ATCC). Ces cellules ont des propriétés de croissance adhérentes et une morphologie sphérique.

Amplification des cellules souches embryonnaires de souris

La culture cellulaire fut réalisée selon la méthodologie de la section précédente. À chaque passage, au moins 3×10^6 cellules furent congelées, résultant en un total d'environ 500 millions de cellules congelées à l'azote liquide avant de débiter la différenciation.

Différenciation des cellules souches embryonnaires de souris

La méthodologie présentée dans la sous-section précédente fut utilisée pour différencier les cellules embryonnaires de souris en cellules cardiomyocytes.

En pétris, les cultures présentaient de la contraction 6 à 8 jours après le début de la différenciation, c'est-à-dire 6 à 8 jours après l'utilisation du milieu de différenciation #1, avec un taux de succès d'approximativement 90%. Une différenciation était dite réussie si une région du pétris présentait de la contraction. En générale, cette contraction n'était cependant pas uniforme à l'ensemble de la culture, mais plutôt répartie aléatoirement en petite grappes de cellules, qui présentaient souvent des fréquences de contraction différentes. Également, le tissu ainsi obtenu ne consistait pas en une monocouche, mais plutôt un tissu de 2 à 3 cellules d'épais. Plus les cellules étaient cultivées longtemps dans le milieu de différenciation #3, plus les zones de contractions augmentaient en superficie, atteignant un maximum aux alentours de dix jours après la fin de la différenciation.

Dans les bassins de PDMS, les cultures ont présenté de la contraction dans 30% des cas, environ 8 à 10 jours après la fin de la différenciation. Le succès de la différenciation y était nettement plus faible qu'en pétris, pour une même différenciation faite en parallèle. Une mortalité supérieure dans les bassins de PDMS qu'en pétris a également été observée lors de l'utilisation du milieu de différenciation #2.

Comme les cultures de cellules souches différenciés en cardiomyocytes présentaient de la contraction, il est possible d'affirmer que cette partie du projet de maîtrise est réussie. De plus, un tissu différencié en utilisant le protocole fut marqué par immunomarquage pour la Connexine 43 (Cn43) et la troponine cardiaque (cTnT), deux marqueurs des cardiomyocytes, démontrant également l'obtention de cellules cardiaques.

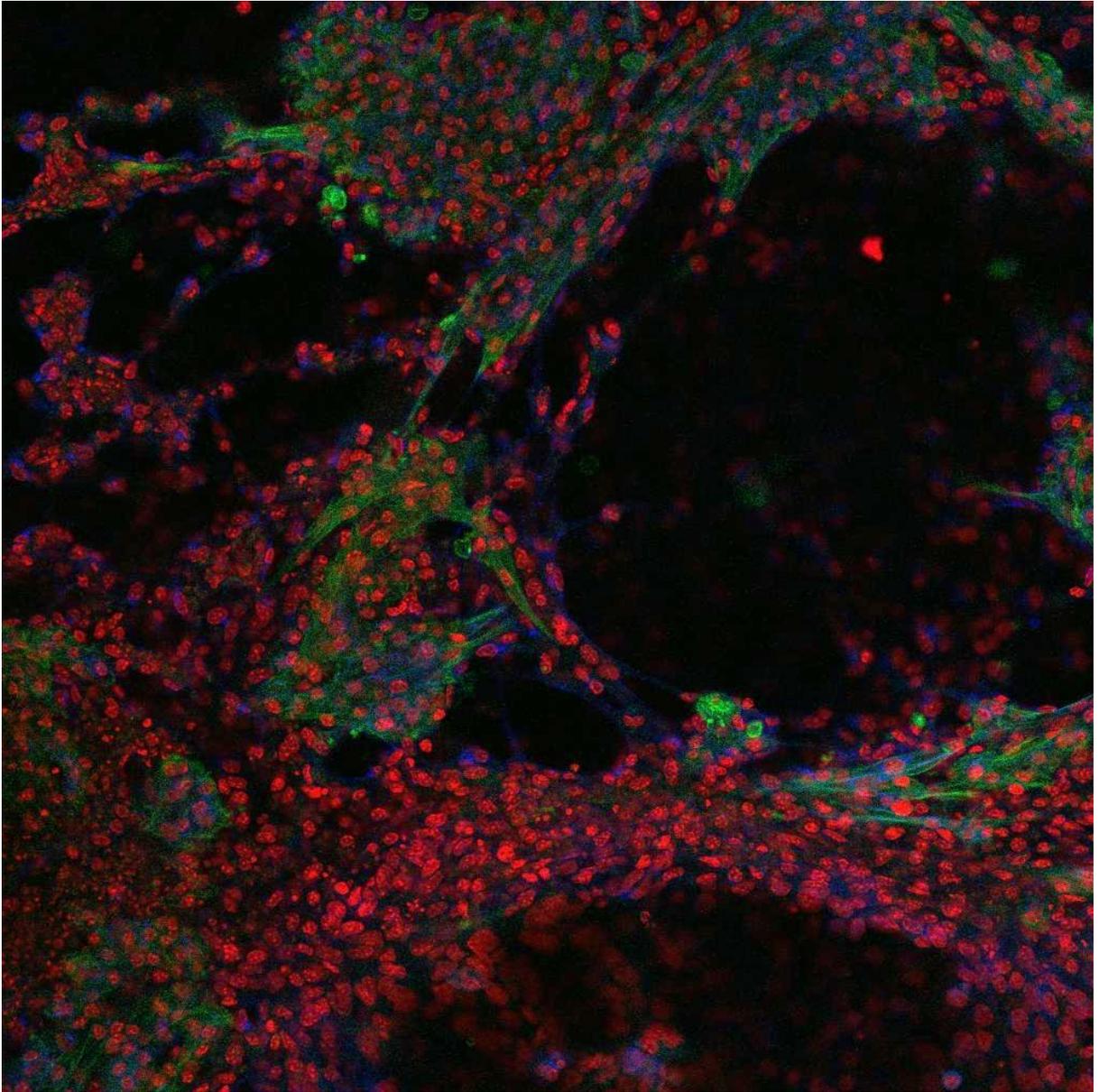


Figure 1: Immunomarquage d'un tissu dérivé de cellules souches de souris par le protocole proposé, où un phénotype de cardiomyocyte est démontré par la présence de Cn43 (rouge) et par la cTnT (vert).

Chapitre 2 – Article

Le système d'imagerie pour l'évaluation en temps réel de cultures de cellules cardiaques, soit la principale partie du projet de maîtrise, était réalisé en parallèle au développement du protocole de différenciation. Ce chapitre présente un article scientifique, portant sur ce système d'imagerie sans lentille. Il présente entre autres la méthodologie employée lors de la réalisation du dispositif ainsi que ses principes de fonctionnement. La validation du système fut réalisée par l'imagerie de cultures cellulaires cardiaques de rats et d'humain. Des images hautes résolution de ces cultures ainsi qu'un signal caractéristique de leur contraction y sont également présentés.

L'écriture de cet article ainsi que la réalisation de l'ensemble de l'œuvre furent réalisées par l'auteur de ce mémoire, à l'exception de la culture des cellules souches pluripotentes induites (sections *Commercial hiPS-CM culture* et *hiPS-CM culture*).

Development of a high-speed imaging system for real time evaluation and monitoring of cardiac engineered tissues

Antoine Belzil^{1,2,3}, Roselle G  linas^{4,5} et Philippe Comtois^{1,2,3}

1 – Research Centre, Montreal Heart Institute

2 – Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Montreal

3 – Institute of Biomedical Engineering, University of Montreal

4 – Laboratory of Genetics and Genomic Medicine of Inflammation, Montreal Heart Institute

5 – Department of Medicine, University of Montreal

Abstract

Stem cell derived cardiac monolayers have high potential for tissue regeneration, *in vitro* drug testing and disease modeling. However, current differentiation protocols are still sub-optimal, resulting in cultures with variable yields and properties. We propose a high-speed lenseless imaging system, integrated with an electrical stimulation unit, to optimize the generation of these cultures. This tool relies on the variations of cellular patterns, during contraction, measured by digital imaging. The imaging system can monitor cardiac cell sheet function and structure, providing the necessary tools to quickly evaluate engineered monolayer. It can record high speed videos and capture high resolution images, from which tissue spatial organization and contractile characteristics can be obtained. Validation of the system was performed using cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cell and neonatal rat cardiomyocytes. The imaging system allows the observation, acquisition and analysis of important data relating to contractile activity development of cardiac cells, making it a promising tool for optimization in cardiac tissue engineering.

Introduction

Globally, nearly 30% of deaths are attributable to cardiovascular diseases (World Health Organisation 2017), with an estimated 92 million of adult Americans suffering from at least one type of cardiovascular disease in 2017, while 43.7% of the adult population of the US is projected to develop some sort of cardiovascular disease by 2030 (Benjamin et al. 2017). Due to the heart's limited capacity of self-renewal and its vital role, the ability to regenerate or heal the heart has always been a major research domain (Berlo and Molkenin 2014).

Resident cardiac progenitor cells have been demonstrated to exist, although resident heart cardiomyocytes are believed to be the main source of ongoing renewal in normal mammalian myocardial homeostasis as well as after myocardial injury (Beltrami et al. 2003; Senyo et al. 2013; Ali et al. 2014). However, these cells are still a relatively inefficient source for regeneration (Berlo and Molkentin 2014). Alternative techniques, involving embryonic stem (ES) cells or induced pluripotent stem (IPS) cells derived cardiomyocytes, either directly injected or as patches affixed to the native myocardium, have been investigated and show promising results (Chong et al. 2014; Kawamura et al. 2012). Focusing on the latter, which we believe allow better control on the newly generated tissue, we propose an integrated imaging tool to help optimize the generation of these patches.

Cardiomyocytes monolayers have been investigated as a therapeutic tool by many groups, leading to the development of techniques to differentiate stem cells towards the cardiomyocyte phenotype, and therefore increasing their potential (Lian et al. 2012). They not only offer the potential for tissue regeneration, but also as an *in vitro* model for drug testing and disease modeling (Navarrete et al. 2013; Zweigerdt et al. 2003). However, current differentiation protocols are still sub-optimal, resulting in cultures with variable yields and properties. Advances in medium composition, mimicking soluble factors secreted by cells, as well as environmental factors have been shown to play key roles during differentiation and maturation. Higher rigidity culture substrates have been shown to impact cardiomyocyte yield and guide the maturation of already differentiated cardiomyocytes (Arshi et al. 2013). Other groups have also shown that long-term electrical stimulation of newly differentiated cardiomyocyte-like cells increased tissue maturation by improving their structural and functional properties, promoted ventricular-like phenotypes, improved calcium handling and increased cardiomyocytes yield amongst other demonstrable benefits (Hirt et al. 2014); (Chan et al. 2013).

Here, we propose a lenseless real-time imaging system to monitor cardiac cell sheet function and structure in culture, providing the necessary tools to quickly evaluate monolayer cultures. This imaging device allows continuous evaluation of contractile properties as well as structural cell organization during culture. Additionally, an electrical stimulation unit is coupled with the imaging system, for long-term and acute stimulation of the tissues. Other groups have previously proposed lenseless imaging set-ups for cardiomyocyte cultures (S. B. Kim et al. 2011; Zheng et al. 2011), though none of these systems were as complete for cardiomyocyte cultures as our

proposed method. We believe that the information the system can provide combined with the appropriate feedback is crucial to develop optimal cardiac tissues for drug screening or engineered replacement tissue.

Methods

Prototype design

Main components

An imaging device, presented in figure 2a, was developed for real time monitoring and evaluation of tissue cultures. The main processing unit of the system is a Jetson TK1 graphic development board, allowing high throughput frame processing. Using the Jetson TK1 with Ubuntu 14.04, enables the system to behave as a stand-alone device. A screen is connected using a HDMI output, and a wireless mouse and keyboard are connected in the available USB3 port. The Jetson can be connected to the internet.

The selected camera is the e-CAM40_CUTK1 (E-Con System Inc., India) which was the fastest sensor compatible with the Jetson TK1 board available at the time of development. The camera uses a 4-lane MIPI CSI-2 interface to the board. It comes on a mounting board with its drivers, allowing for easy “plug-and-play” with the Jetson board. Since it was supplied with a sample application with limited functionalities, programs were developed to control the camera and acquire sets of images, as detailed in the following sections.

Imaging sub-unit

As our system is lenseless, the “shadow-imaging” approach was selected as the imaging technique. Although it does not allow for magnification, its wide field of view and minimal post processing make it a suitable technique for real-time imaging and processing. In brief, a LED (M505L2, Thorlabs inc.), controlled by a LED driver (DC2100, Thorlabs inc, USA), illuminates a pinhole (D610-1500-MD, Thorlabs inc) positioned approximately 5 cm perpendicular to the sample and rests on the imaging sensor. Since the pinhole is distanced from the sample, the light waves can be considered planar and the objects, which in our case are mostly transparent, refract

light. As the image sensor is very close (less than 200 μm) the diffraction is minimal, and the images received consist of small rings corresponding to the area of each cell. This lenseless technique is limited by the resolution and size of the sensor. The sensor of the camera is the Omnivision OV4682 RGB IR - 1/3" Optical format CMOS which has a pixel size of 2 μm by 2 μm and an area of 5.44 mm by 3.07 mm. The intensity of the LED can be controlled through the Led Driver either manually or by a low voltage input provided by a digital to analog converter (DAC) (MCP4725, Microchip) wired to the Jetson TK1 and communicated with by I2C (figure 5a). The gen2-I2C bus is used for communication as it works with 3.3V and is available from the expansion header on pins J3A1.18 and J3A1.20. As the camera relays the pinouts because it occupies the entire expansion header, the wire connections in its own expansion are as follow: SCL - CN1.42, SDA - CN1.47, Vcc - CN1.37, Gnd - CN1.2. For ease of connection, the output of the DAC is connected to a BNC connector (figure 2, jj) (1-1634612-0, TE Connectivity AMP) and the connection between the LED driver and the system is ensured by a coaxial cable.

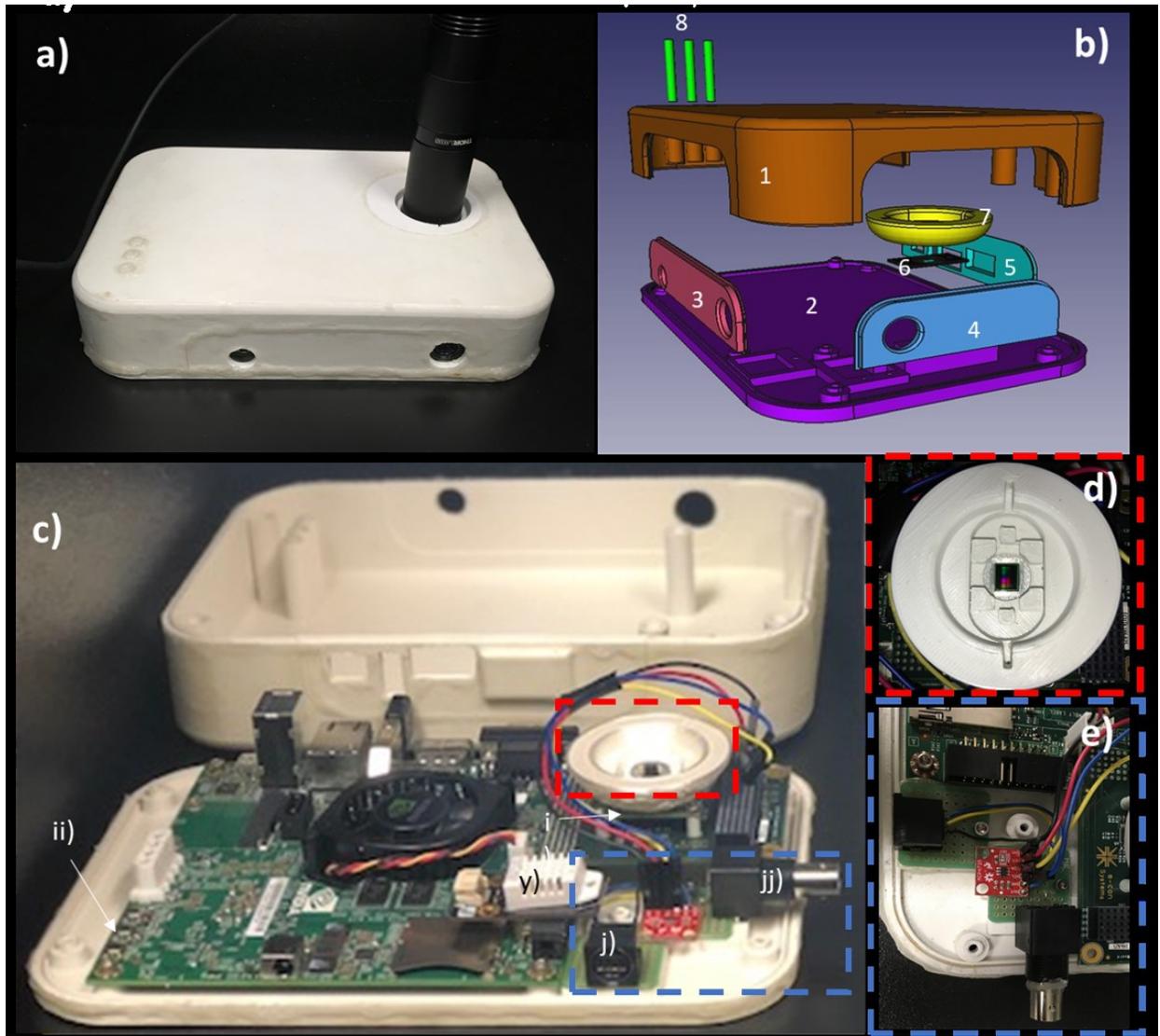


Figure 2: Imaging module design. a) Closed view of the prototype, b) CAD exploded view of the system enclosure designed for the protection of the imaging device, c) open view of the embedded system, d) overview of the culture area and e) zoomed view of the added connectors and circuits. The casing was designed specifically for the purpose of protecting the electronic components from shocks and humidity. In addition to the casing, a thin coat of silicone (Leak Seal, Rust-Oleum) has been applied to both sides of each printed piece. The casing is formed of eight different components that easily “click” together. The top (1) and bottom (2) hold the three side panels (3-5) while parts (6) and (7) are screwed from under the image sensor’s PCB as showed in i). Three copies of part 8 are slid in the top part (1) to allow button controls on the Jetson development board (ii) and are held by the silicone coat. In addition to the already present power, usb3 and ethernet connectors, a 9 pins (j) and a BNC (jj) connectors have been added inside the case. The BNC is connected to the DAC (jjj) in order to modulate the input to the LED driver (DC2100, Thorlabs Inc, USA) while the 9 pins connector is only connected to the necessary I2C pins of the Jetson development board (figure 2e). Additional pins have been left available for future features. A humidity and temperature sensor (y) was fixed with “hot glue” on top of the Jetson.

Additional sensors

Two additional features were added to the main unit, a 9-pin connector (MD-90S, CUI INC) and a humidity and heat sensor (SEN0137, DFRobot). The first links the four pins required for I2C communication mentioned above with the electrical stimulation sub-system and will allow further future add-ons. The humidity and heat sensor was mainly used for testing and validation of stability when used in the incubator. It was connected to another workstation by USB for display in the Arduino IDE console. The wiring was passed through the BNC connector hole in the casing.

Prototype casing

To protect the whole system from liquids, small impacts and humidity, we designed a case (figure 2b) and 3D printed it in Polylactic Acid (PLA) (Polar White, CEL Robox) using a 3D printer (RoboxDual Micro-Manufacturing Platform, CEL Robox) with 0.4 mm resolution. This case is formed of eight different parts interlocked with each other. The top and bottom components have a length of 210 mm, a width of 140 mm, and heights of 39 mm and 6 mm respectively. The bottom part has holes to allow the Jetson TK1 board, the BNC connector, the 9-pin connector and the top part to be tightly screwed in and provides a supporting pad for the imaging sensor. The three side panels are held in place by the top and bottom components and allow access to the systems connectors. These panels have been printed separately from the top piece to facilitate assembly, as some connectors protrude from the casing, and allowing future design modifications. As cell culture is performed on top of the imaging sensor, a circular 100 μm glass slip (12-545-80, Fischer Scientific) is glued to a thin rectangular part (figure 2b-6) over which a bowl-like component (figure 2b-7) is positioned to hold it in place. Silicone (Clear Kwik Seal, Dap) is applied at the junction between the two parts to completely seal this protective structure and both are held in place by screws on the image sensor. These parts add no more than the thickness of the cover slip between the sensor and the culture wells. They can be easily replaced if scratched or damaged. Three thin cylinders (figure 2b-8) are slid in the top part to allow pressing of the Jetson TK1 control buttons and are held in place by silicone. All parts of the casing are sprayed with silicone (Leak Seal, Rust-Oleum) on both sides before assembly, sealing them completely. Once assembled, the casing-to-casing and wire-to-casing

junctions are sealed with commercial silicone (Clear Kwik Seal, Dap), protecting the electrical components from the high humidity present in culture incubators.

Culture wells

In order to minimise the light diffraction, it was essential to minimize the distance between the sensor and the sample. Since the imaging surface area of our system is no more than 5 mm by 3 mm, we created custom culture wells (figure 3c and d) with Polydimethylsiloxane (PDMS) (184 Silicone Elastomer Kit, Sylgard), a transparent and widely used silicon-based organic polymer (J. N. Lee et al. 2004). These wells have thin bottoms ($<100\ \mu\text{m}$) and a tunable rigidity by selecting the ratio of curing to polymer (Arshi et al. 2013; Boudreau-Béland et al. 2015). These wells are created with our designed two-part molds (figure 3a) machined in polycarbonate (Lexan, Sabic Inc.) with a CNC (iModela, Roland) using a Flat End Mill (EMF-125-2F-031, Roland). PDMS is first mixed, then stirred for five minutes and degassed before being poured into the mold. Two carbon electrodes ($\sim 4 \times 5 \times 1.25\ \text{mm}$, SK-05 ISO Graphite Plates, Industrial Graphite Sales LLC) can be placed in the mold (figure 3a. i) before curing for tissue electrical stimulation. To assure a flat finish and the exact height of the wells' bottom, a plastic cover slip is gently placed over the mold, avoiding the formation of bubbles in the process. Once cured, if electrodes have been included, holes are punched on the side of the wells and 1-inch wires are soldered with silver paste (8331-14G, MG Chemicals) to the electrodes. The resulting wells have an outside diameter of 11.9 mm, an inside diameter of 9.0 mm and a height of 4.5 mm, while the primary culture area between the electrodes is of 3.1 mm by 5.5 mm. Before cell culture is performed in these wells (figure 3b), since PDMS is hydrophobic (Bodas and Khan-Malek 2007), a 60 seconds air plasma treatment (PDC-32G, Harrick Plasma Inc) is required to improve hydrophilicity of the membrane. Plasma treatment of the wells helps with adhesion of the cells.

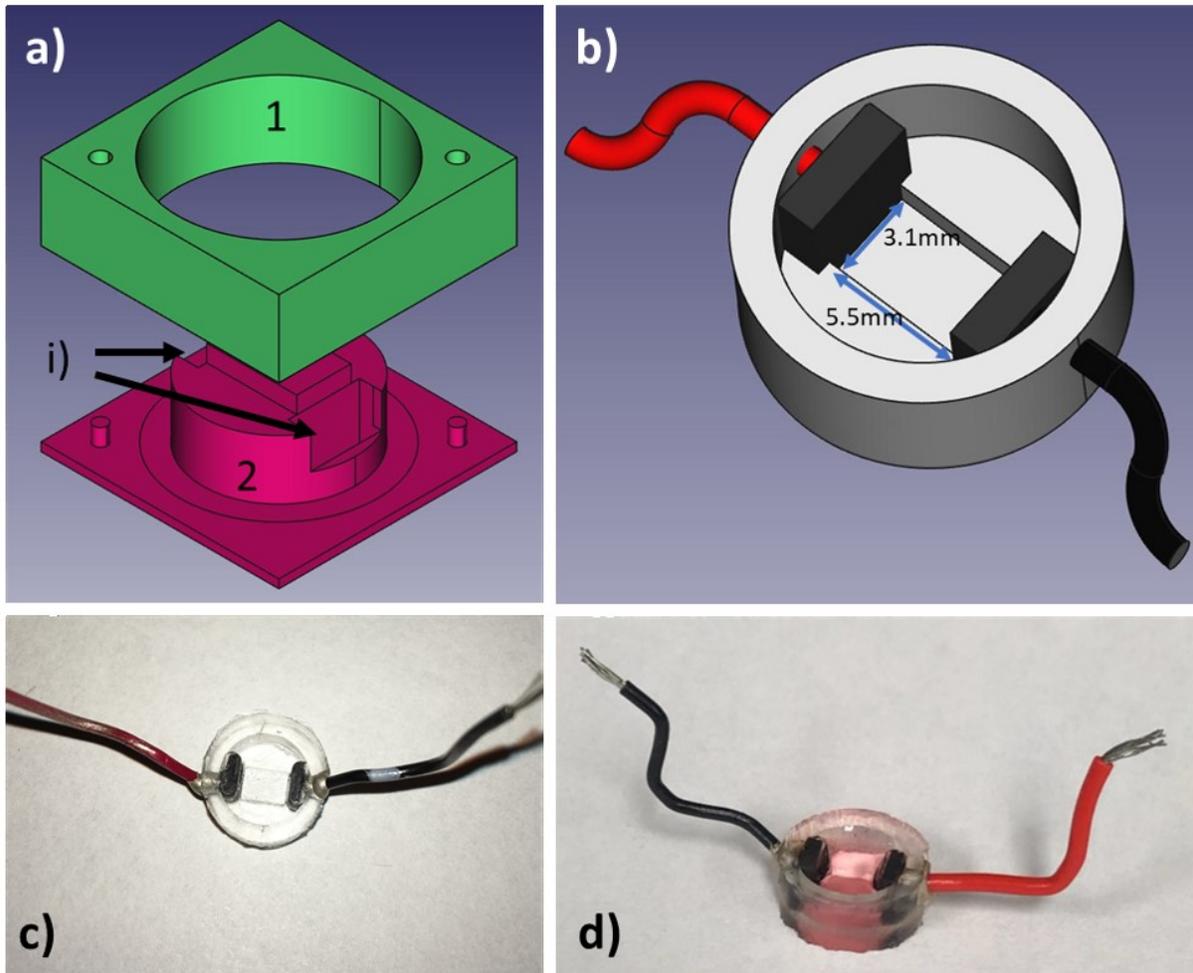


Figure 2 : Design of the PDMS culture well. a) CAD exploded view of the mold use to create the wells, b) is the CAD representation of the culture wells with electrodes and wires for field-stimulation, c) is a picture of the wells in PDMS after unmolding and d) the well filled with culture medium and seeded with cells. To create the wells, two carbon electrodes are positioned in slots labeled i) after part 1) of the mold is firmly in place on top of part 2). Liquid PDMS is then poured into the mold. To ensure a fixed height for the bottom of the well, part 1 is 0.1mm taller than part 2. In addition, a cover slip is placed on top of part 1 to ensure a flat finish. The mold is then placed in the incubator at 37 degrees overnight. After unmolding, holes are punctured on the side of the wells to allow the cold soldering of the wires using silver paste (8331-14G, MG Chemicals) and let to cure for a minimum of 4 hours. Before seeding, wells are submerged in 70% ethanol and rinsed with dH₂O before passed under UV light for a minimum of 30 minutes.

Electrical stimulation sub-unit

An electrical stimulation unit (figure 4a) has been developed for transient as well as chronic stimulation during stem cell-derived cardiomyocyte maturation. This unit is linked to the imaging unit by a cable plugged in the 9-pin connector on both units. As previously mentioned only 4 of these wires are currently used, more specifically 5V, Gnd, SDA and SCL. This unit has a tunable frequency, duration of pulse and current intensity. It is based on an Arduino Uno driving a “H-Bridge”-like electrical circuit. The schematic of the circuit is presented in figure 4b. Stimulation intensity is modulated using a DAC (MCP4725, MicroChip) connected to a non-inverting op-amp circuit. The resistances create an amplification ratio of 3 ($R_9=0.5\text{ k}\Omega$ and $R_{10}=1\text{ k}\Omega$) while the op-amp (LM675T, Texas Instrument) allows for high current generation. In our set-up, the DAC output is between 0 and 3.3 V, while the supply voltage for the op-amp is 12 V. Although we did not use a rail-to-rail op-amp, the stimulation current is suppressed when all switches (Q1-Q2-Q5-Q6) are open. In addition, our circuit allows the passage of current between the electrodes (R5) in both direction with only one current source. The Arduino Uno controls the opening and closing of the switches by applying 5V to its pins 9 or 10. In the electrical circuit, R8 has been divided into two 5 W resistances totaling 50Ω with the purpose of limiting the current through the cell culture to 200 mA. One has been placed where R5 is depicted in the schematic and the other at R8. To get the current to the cell culture well, two wires (figure 4a i) leave from one side of R5 and are connected to the wires soldered to the carbon electrodes. In a similar manner than for the imaging unit, a case has been designed and 3D printed in PLA, consisting of a bottom and top part screwed together. These printed parts are also spray coated on both sides with silicone (Leak Seal, Rust-Oleum) and all junctions are sealed with silicone (Clear Kwik Seal, Dap).

Programming

All functionalities of the system are controllable by the Jetson TK1 (figure 5a). Having its own distribution of Ubuntu installed, it is possible to run different programs developed for this

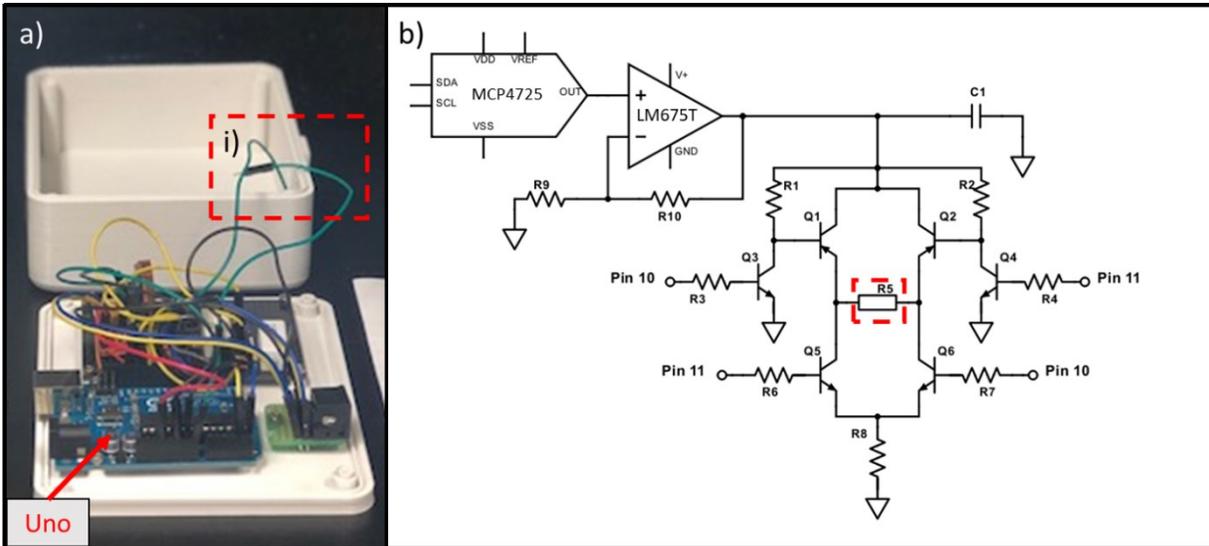


Figure 3 : Electrical stimulation module: a) an open view of the prototype; b) schematic of the circuit. The system relies on the same principle as an H-bridge, where “switches” created with transistors (Q1, Q2, Q5 & Q6) are closed in alternation to allow the same current to pass through the tissue (R5). $R8=50* \Omega$, is the safety resistance that limits the current to a maximum of 200 mA. The frequency and the duration of the biphasic stimulation is controlled by an Arduino Uno (1), which applies or not 5V to pins 10 or 11. The current intensity is controlled by the imaging unit via a DAC communicating by I2C. The voltage generated by the DAC is multiplied by a factor of 3 using a simple non-inverting op-amp circuit, where $R9=500\Omega$ and $R10 = 1000\Omega$. Capacitor C1 (10 nF) has been placed as close as possible to the input of the “H-Bridge” to minimise the interference noise. Additionally, a heat sink has been apposed to the back of the op-amp to limit heat noise.

project and achieve evaluation and monitoring of cardiac cell cultures. The main programs can be divided into four categories: illumination, imaging, electrical stimulation and analysis. The code for the embedded system has been written in C, while part of the analysis’ post-processing is performed in MATLAB (Mathworks, 2018) at this stage.

Illumination and imaging

The first two functionalities have been grouped and presented in a graphical user interface (GUI) developed with GTK3+ (GTK+ Team). The Linux library i2c-dev and the system ioctl library are used to communicate with the DACs. The I2C pins are accessed on an adapter from the userspace and the I2C file, once opened, is written to with the “i2c_smbus_write_word_data” function. For the imaging system, the V4L2 API manages the setup and frame grabbing of the

imaging sensor and GStreamer the image handling and display. The principal steps for the first part are the following: open the device, set up the exposure, negotiate the frame format and the method used to access the frames, create and allocate the memory for the different buffers, generate a main loop where frames are acquired from the sensor and, when finished with the program, close the device and free the memory. More information on the V4L2 API can be found in the Linux Media Subsystem Documentation (Linuxtv, 2018). Here, the main loop of the code is called by a timer with a duration of 3 ms, the method used is primarily mmap and the frame format is BGGR (BG10) with either 672 x 380 or 2688 x 1520 pixels per frame acquired. The theoretical acquisition speed is capped at 330 frames per second (fps) as given by the manufacturer, justifying our use of a timer every 3 ms. It is worth noting that in practice the frame rate is going to be limited by the selected exposure. In the main loop, each grabbed frame is put in a buffer from which three actions can be done simultaneously (figure 5b). If a video is being recorded, each of these frames is temporarily placed in a larger buffer until enough frames have been acquired and the whole buffer is written to a binary file. This method allows for high speed acquisition and conservation of the entire information contained in the frames. To display the grabbed frames on screen, one frame every 60 ms is pushed to the GStreamer pipeline presented in figure 5c. The frame format, specific to the CMOS sensor, is 10 bits raw BGR-IR. Instead of a second green pixel as in regular BGR format, it acquires infra-red (IR) intensity and each color pixel is stored in a 16 bits word where the 6 most significant bits are unused. For simplicity and to facilitate the use of pre-existing GStreamer elements, pre-processing of the frames is performed before feeding them to the Appsrc element: Replacing the IR pixel with green values and converting the 16 bits per pixel to 8 bits. To save images to memory, a similar pipeline to the display one has been created with a mpeg and filesink element replacing the videosink element present in figure 5c.

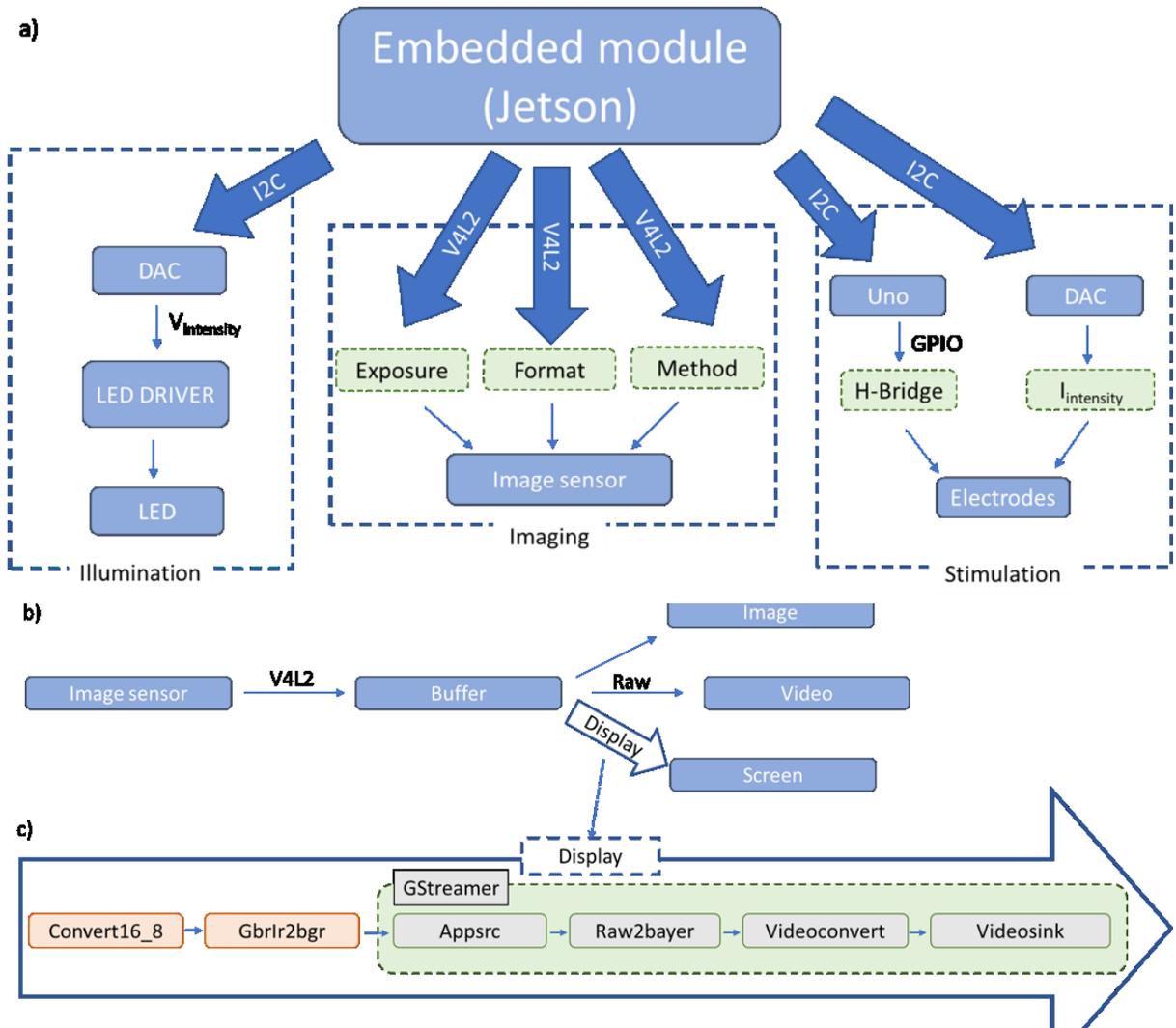


Figure 4: Schematic representation of the high level interactions between the different components of the system: a) downstream relationship between the main module (Jetson TK1, Nvidia) and the principal systems, (sample illumination, imaging and electrical stimulation); b) upwards passage of information from the image sensor to the main module; c) pipeline used for the display of frames on screen. The illumination module relies on the possibility of our LED driver (DC2100, Thorlabs Inc, USA) to be modulated externally by a voltage input. Our program allows communication with a mounted DAC module (MCP4725, Microchip) via I2C communication. With this approach, the LED is turned on only when acquiring images and it is possible to modulate the light intensity when imaging cultures.

Electric stimulation

A custom communication protocol using the same I2C technique presented above has been developed for the communication between the Jetson and the Arduino Uno, which acts as a slave to the imaging unit presented in figure 2. A command such as the “frequency” is sent first, then the desired value is sent in the next message. On the Uno side, it is constantly listening for new commands and once it receives one, does the appropriate changes in its stimulation settings. Electrical stimulation requires the start command to begin, as it is by default in the stopped state. Communication with the DAC is done as for the illumination system, calling 0x61 instead of 0x60 for the DAC’s address. In both cases only the 0x40 registry is written to, updating only the DAC register and not the EEPROM.

Real time analysis

The analysis is performed in two steps. The first step is done while the signal is acquired, whereas the second is done in post processing on a workstation. The two follow the same logic to get the contraction rate of the tissue. The idea is to get the variation rate of light intensity per pixel, as captured by the sensor. Since the LED intensity is kept constant, the only thing affecting the intensity received by the sensor is the cells contraction. To calculate the rate, we subtract the total frame intensity of two frames and divide by the time separating the two. As the number of frames per second acquired is known, the only parameter that needs to be set is the delay between frames (τ), which we set at 6 times the fps divided by 100, based on empirical analysis. For a video with an acquisition speed of 200 fps, this means the delay between frames would be of $\tau=12$ frames. The equation below is therefore used to acquire the composite signal:

$$\Delta S(t) = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{j=1}^{N_y} \sum_{i=1}^{N_x} \left| \frac{M_{i,j}(t) - M_{i,j}(t-\tau)}{\tau} \right| \quad (\text{eq. 1})$$

This derivative like algorithm gives a continuous signal characterised by two peaks, one of which is associated to the contraction of the tissue and the other to the relaxation (figure 7a & b). The contraction peaks are found automatically using an algorithm which uses an adaptive

threshold, first derivative sign change and a minimum peak width. From the time between two contraction peaks, we deduce the beating rate of the tissue and display it in real time. The obtained signal and the detected peaks are plotted in an allocated zone of the GUI using the Cairo library.

Post processing

The post processing consists of creating movie format files from the binary files acquired with the camera, getting more information from the composite signal described above and creating activation maps of contractions. The first is either done on the embedded system, by passing the frames read from the binary files to a GStreamer pipeline, or with MATLAB on a separate workstation. This GStreamer pipeline has the same elements as in figure 5c, but with a video encoder and file sink elements instead of the video sink. In MATLAB, this task is performed using the *videowriter* object and the *raw2rgb* functions. In addition to the beating frequency, we propose to look at the ratio between the contraction and the relaxation peak and the time between the two. We believe these signal characteristics are an important source of information as they are directly impacted by physiological phenomenon. For example, if the action potential duration is increased by lower temperatures, the time between the contraction and relaxation peak is expected to increase. To get these signal characteristics, the peaks are found in MATLAB using the “findpeaks” function with custom input arguments and the characteristics computed automatically. The final postprocessing task is the creation of activation maps. These maps allow to determine the propagation speed of the contractile activity and to evaluate the ectopic stability. To achieve this, a 31 by 31 window is first passed over each frame and the contractile signal, the speed of light intensity variation, is computed for each pixel. All contraction peaks are found, and each beat is isolated. Maps are then plotted where the time at which each pixel has contracted is color-displayed.

Validation

To test the different functionalities of the device, different cardiomyocytes cell lines were used: neonatal rat cardiomyocytes (NRCM), commercial (NCardia-CM) and non-commercial human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hiPS-CM). Each one was cultured according to their respective protocols, as detailed below. The validated functionalities with all

three cell types were the capacity to acquire clear images of the cultures, obtain videos of contracting tissue, compute the contractile signal from these videos and creating the activation maps. Electrical stimulation validation was performed only with the NRCMs.

Neonatal rat cardiomyocyte culture

Animal handling procedures were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Montreal Heart Institute Animal Research Ethics Committee. Beating hearts were removed from sacrificed Sprague-Dawley rats, aged one to three days old, and kept on ice in Ca^{2+} and Mg^{2+} free Hank's balanced salt solution. Ventricular muscle tissue was excised and cut into 1-3 mm^2 pieces. Purification was performed over night using a Neonatal Cardiomyocytes Isolation System (Worthington Biochemical). In parallel, PDMS wells were immersed into 70% ethanol and rinsed with distilled water, plasma-cleaned for 1 minute (PDC-32G, Harrick Plasma Inc) and then sterilized under UV light for 1 hour. Following purification, cells were seeded in the prepared PDMS wells at a density of 30 000 cells per well and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SLM-220-B, Millipore) with 10% fetal bovine serum (FBS, ES-009-B, Millipore) and 1% penicillin/streptomycin (TMS-AB2-C, Millipore). Culture wells containing the cells were placed either on the sensor or in a 10 cm petri dish and in the incubator at 37°C and 5% CO_2 . Imaging was performed 3 days after seeding.

Commercial hiPS-CM culture

Cor.4U® Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes (NCardia, Germany) were thawed as described in the manufacturer's protocol and maintained in Cor.4U® complete medium as previously described (Gélinas et al. 2017). hiPSC-CMs were thawed and plated onto 0.1% gelatin coated 12-well plate (2×10^5 cells per well) and culture medium was replaced every 3 days until analysis (less than 60 days). hiPSC-CM were then dissociated by incubation with TrypLE Express (Gibco) at 37°C for 10 minutes before being plated directly onto the gelatin coated PDMS wells (10×10^4 cells per well). Spontaneously beating cells were seen 2 days after being plated. Imaging was performed two days after observing spontaneous activity.

hiPS-CM culture

Commercially available hiPSC (CW200-47, CIRM) were differentiated to hiPSC-CM using a small molecule modulation differentiation protocol followed by a glucose starvation as previous published by Sharma A. *et al.* (Sharma et al. 2015). Approximately 100 000 hiPSC were plated on hESC qualified Matrigel (Corning) coated 6-wells culture plate. Once 85% confluency was reached, hiPSC were incubated with 6 μ M CHIR99021 (Sigma) in RPMI/B27 minus insulin (Life Technologies) for 48 hr. After 48 hr medium was changed to RPMI/B27 minus insulin until day 3 when medium was replaced by RPMI/B27 minus insulin with 5 μ M Wnt inhibitor IWR1 (Sigma) for 48 hr. At day 5 medium was changed to RPMI/B27 minus insulin for 2 additional days. At day 7, medium was replaced with RPMI/B27 (with insulin). Spontaneously beating hiPSC-CMs were observed between day 7 and day 10. At day 10, medium was changed to low glucose RPMI/B27 and cells were maintained in this medium for 3 days. At day 13, cells were washed with DPBS to inhibit contraction and cells were dissociated using TrypLE Express (Gibco) with 0.5 U/ml liberase TH (Roche) at 37°C for 10 minutes. Cells were then diluted in 5 ml RPMI/B27 before being centrifuged. Cells were resuspended in 1ml RPMI/B27 and passed through a 100 μ m cell strainer before being plated directly onto the Matrigel coated PDMS wells (5 X 10⁴ cells per well). Contraction was seen after 3 to 5 days.

Results

Each module of the system was first validated individually, while the complete system was validated using all three cardiomyocyte cell types.

Prototype assembly

The imaging sub-system is presented in figure 2a and 2c, while the electrical stimulation sub-system is presented in figure 4a. Once assembled, Ubuntu 14.04 as well as all the required programming libraries and drivers were installed on the Jetson TK1. Validation of the imaging system was achieved by acquisitions of images of random shapes placed on top of the sensor. All connections were tested using a multimeter and sealing was tested using the humidity and heat sensor, with the prototype inside a conventional incubator at 100% humidity. Although some humidity could infiltrate the casing, humidity level inside the case did not rise above 70%

in a 10-hour monitoring period. Evaluation of the illumination system was performed using the imaging sensor as a measuring tool for light intensity. The system was deemed validated once light intensity was fully tunable by the main unit. The current intensity driving the LED was fixed to a range of 0 to 200 mA, corresponding to an input voltage range of 0 to 3.3 V.

Cell culture

All cell cultures were performed according to the protocols presented above and in accordance with good manufacturing practices (GMP). For the cardiomyocytes derived from stem cells, the phenotype was deemed achieved when tissue contraction was observed. In neonatal rat and NCardia's cardiomyocytes, close to 100% of the tissue were considered to be cardiomyocytes, while the hPSC-CM were close to 100% differentiation following purification. An image of cardiomyocytes cultured in a PDMS well is presented in figure 3d.

Each well was unmolded and tested for leaks with dH₂O, then submerged in 70% ethanol before being sterilised under UV light for a minimum of one hour. For neonatal cardiomyocytes, wells were plasma-cleaned before being sterilised by UV.

Tissue Imaging

Acquisition of images of the different cell types

A sample image of each cell type is presented in figure 6. Exposure was set to 10 ms, the input voltage for light intensity was set to 1.65 V and the frame size was 2668 x 1520 pixels. In figure 6a, neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) are imaged three days after seeding in the PDMS well. While it is possible to easily see cell contours, 100% confluency is not achieved in this image as cells would have required additional days to form a fully connected tissue. In figure 6b, NCardia's commercially available hPSC derived cardiomyocytes are imaged four days after seeding. The long darker lines present in the image are due to scratches and debris on a mold piece. Tissue growth is good in this case as most cells are touching their neighbors. Individual cells are hard to distinguish within the tissue as compared to a lower density. In figure

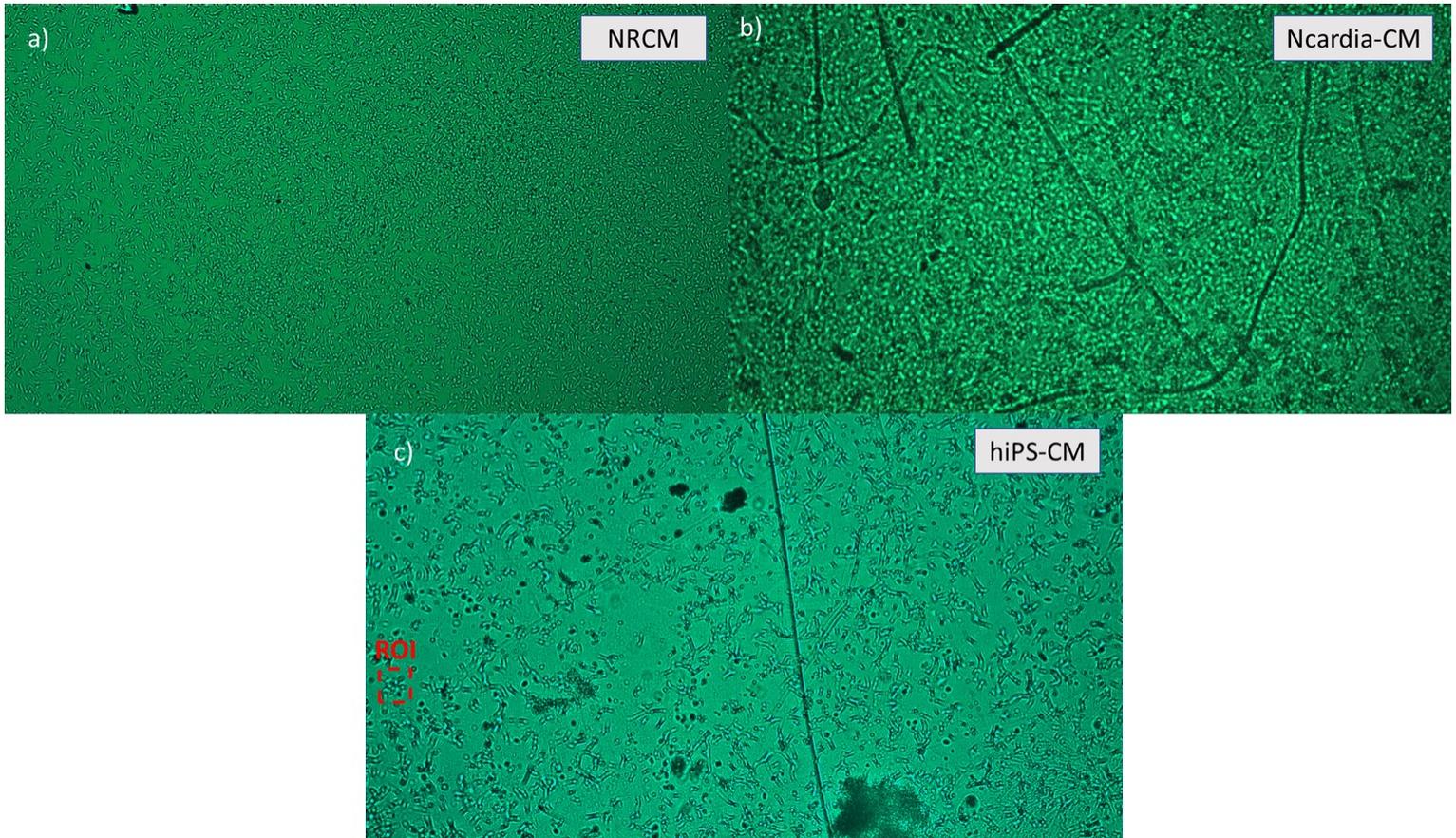


Figure 5 : Different cell lines captured and monitored with the device. a) Neonatal rat cardiomyocytes seeded 3 days prior to imaging at a density of 30 000 cells/well (~ 1875 cells/mm²). b) Ncardia commercial cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells (hIPSC-CM) seeded 4 days prior to imaging at a density of 50 000 cells/well. c) In house hIPSC-CM, seeded on the PDMS wells 3 days prior to imaging at a density of 5 000 cells/well.

6c a tissue of cardiomyocytes derived in house from hIPSCs are presented. Seeding was of 5000 cells per well, allowing for clearly distinguishable cells. By doing this we validated the possibility for individual cell monitoring. In summary, these high-resolution images provide information on the tissue organisation opening to the possibility for spatial pattern analysis.

Contractile signal from videos

Videos of 10 to 20 seconds, with acquisition speed ranging from 100 to 300 fps, were recorded. Led intensity was adjusted as the exposure of the sensor was changed to reach high fps. Contractions could be observed in real-time, confirming that the tissues were usable for our analysis purposes and validation. Contractile signals for each cell type are presented in figure 7. In figure 7a, we show the signal obtained from a tissue of commercial cardiomyocytes derived from hIPSCs. The contraction and relaxation peaks observed are due to the spontaneous activity of the tissue. As an example of the signal characteristics derived from such signal, the average characteristic parameters of this tissue were the following: a period (T) of 710 ms, a time between contraction and relaxation (Δt) of 200 ms and a contraction intensity over relaxation intensity ratio (C/R) of 0.94. In figure 7c and 7d the signal is obtained from tissue of neonatal rat cardiomyocytes. Figure 7e shows the signal from a tissue of cardiomyocytes derived from hIPSCs while figure 7f shows the signal from mESC derived cardiomyocytes.

The stability of these parameters was evaluated within the same acquisition and over time while keeping the environment stable (data not shown). Four video recordings of 10 seconds of the same NCardia-CM tissue, taken 30 minutes apart, were used for this analysis. All three characteristics were stable. Within the same recordings, the highest standard deviation measured was of 0.090 for a period of 1.35 s, 0.026 s for a delay between peaks of 0.340 s and 0.034 s for a peak ratio of 1.243. Over time, the means of each of the average characteristics from each video had standard deviations no higher than 0.01, meaning the measurements were reproducible if the environment was kept stable.

Signals obtained from different wells containing same species tissue were compared in regards of the contractile characteristics dependent on the spontaneous beating period. For this, we used seven different wells containing neonatal rat cardiomyocytes. The seeding density was of 1.9×10^5 cells per cm^2 . We recorded videos three days after seeding, each video lasting 10 s with

acquisition speeds of 100 fps. Four of these tissues had beating rates higher than 2 Hz, while 6 had rates higher than 1.5 Hz. Only one had a lower beating rate, which was of around 0.33 Hz. No exact relations could be deduced from these measurements, although a trend was observable; time between contraction and relaxation decrease as the beating rate increases while the peak ratios increases with the frequency.

In figure 7c and 7d, we show the impact of the delay between frames, “ τ ” in equation 1, on the signals obtained from the same video recording of spontaneous activity of neonatal rat cardiomyocytes. In figure 7c we used a delay of 6 images (with 100 fps), meaning the time between frames is roughly 60 ms, whereas in figure 7d, we used a delay of 3 images, resulting in a 30 ms delay. As it is observable when comparing the two, figure 7d has a noisier signal which can lead to harder peak detection, as it can be observed in the first relaxation peak. On the other hand, having a smaller delay means the speed of variation of light intensity is closer to the instantaneous change and the obtained signal is more representative of the contraction speed of the tissue.

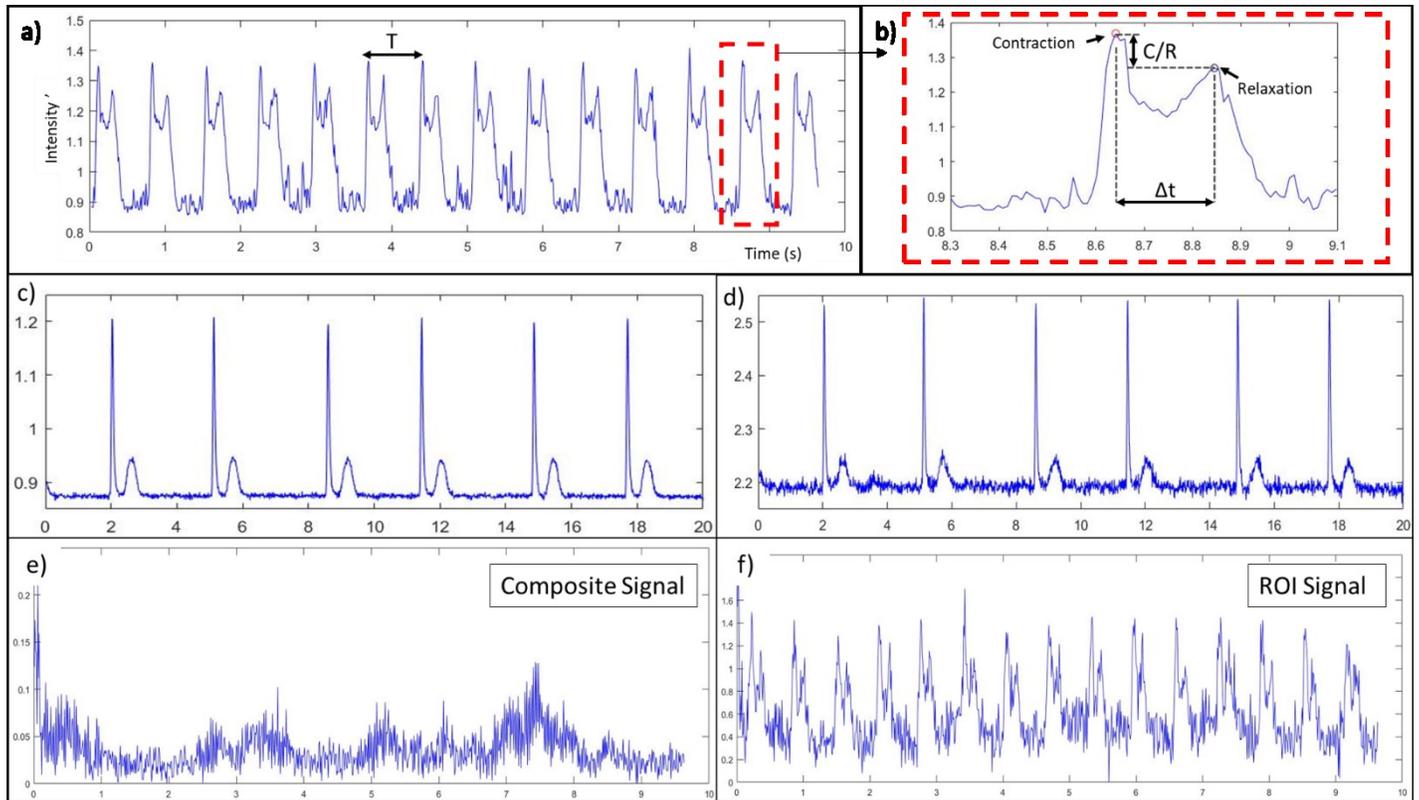


Figure 6 : Contractile signals computed from videos captured with the imaging device. a) Characteristic composite signal from tissue composed of Ncardia cardiomyocyte derived from hIPSC, b) contraction-relaxation pair zoomed view and contractile characteristics identification. c)-d) Characteristic composite signal from NRCM tissue computed with a delay of acquisition of 6 (c) or 3 (d) between frames. e) Composite signal from tissue of in-house hIPSC derived cardiomyocytes seeded at low density (figure 6c), f) contractile signal of the region of interested (ROI) (see figure 6c).

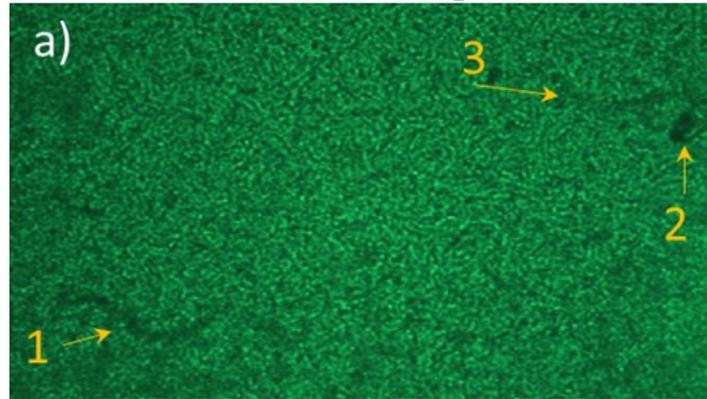
Activation maps

Activation maps of the different tissue types were produced from recordings. An activation map made from the signal acquired from a neonatal rat cardiomyocyte sheet is presented in figure 8b, with an image of the tissue (figure 8a) as well as their superposition (figure 8c). Activation maps allow finding the origin of contraction as well as the stability of the ectopic center. By looking at figure 8b, we can deduce that the origin in this case is in the bottom left corner of the tissue. Superimposing the activation map with the image gives more insight into the structural dynamics of the tissue as we can determine where connections are present and which regions contract. Using figure 8, we observe that markers 1 and 2 appear as darker objects in the initial image (7a) than marker 3. The effect of those tissue “defects” on its contractile capabilities are

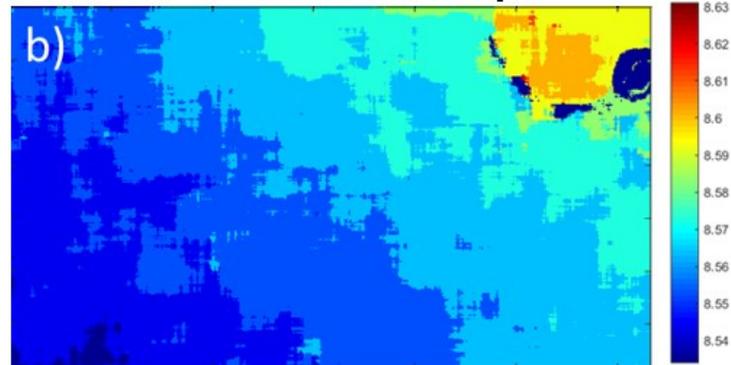
not what we had expected since only the zone of marker 3 seems to have a direct impact on the propagation, acting as a blocker of contraction. It is possible zone 2 impacts the cells above it, though it is lower than the circular region without contraction. Zone 1 does not seem to impact the tissue contraction, meaning it was probably just a defect on the outside of the well. Also, the activation maps allow to approximate contraction propagation speeds. In the case of the tissue presented in this figure, we can observe a propagation from bottom left to the top right, meaning an approximate distance of 6 mm, in around 60 ms. This corresponds to a propagation speed of 100 mm/s. Of note, the difference in size between the activation map and the image is due to the algorithm creating the map because only pixels covered in full by the convolution matrix (31 x 31 pixels) are kept (no zero-padding was used for border pixels).

In addition to validating the prototype's capacity to generate these activation maps, we explored the effect of the acquisition speed on both the contractile signals and activation maps. For this, we used the same tissue preparation of NRCM, and took two acquisitions of 975 frames, one at 100 fps the other at 200 fps. The resulting signal and activation maps for their first contraction are presented in figure 9. The contractile characteristics computed from the videos are as follow, respectively: a beating frequency of 1.47 Hz and 1.39 Hz, a time between peaks of 192 ms and 186 ms, and a relaxation to contraction ratio of 0.521 and 0.563. As these videos were taken in an environment where small variations in temperature are possible over time, this could explain

Tissue Image



Activation Map



Superposition

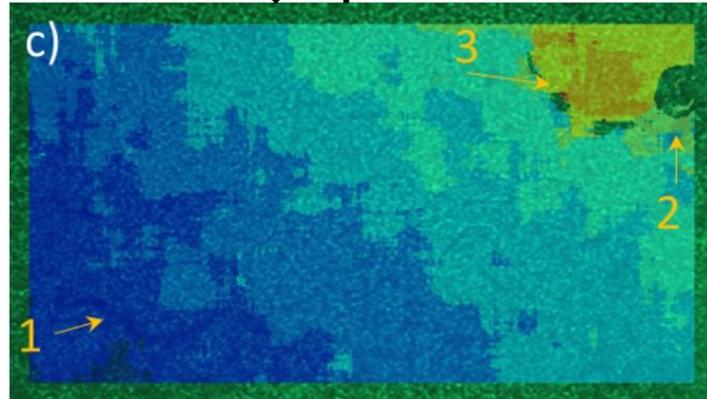


Figure 7 : Superposition of the activation map on the tissue image; effect of tissue organisation on contraction. a) Neonatal rat cardiomyocyte image with the imaging device, b) activation map of the first beat from the contractile signal, c) superposition of a and b. From the activation map, the contraction origin is found to be in the bottom left corner with a linear propagation towards the top right corner.

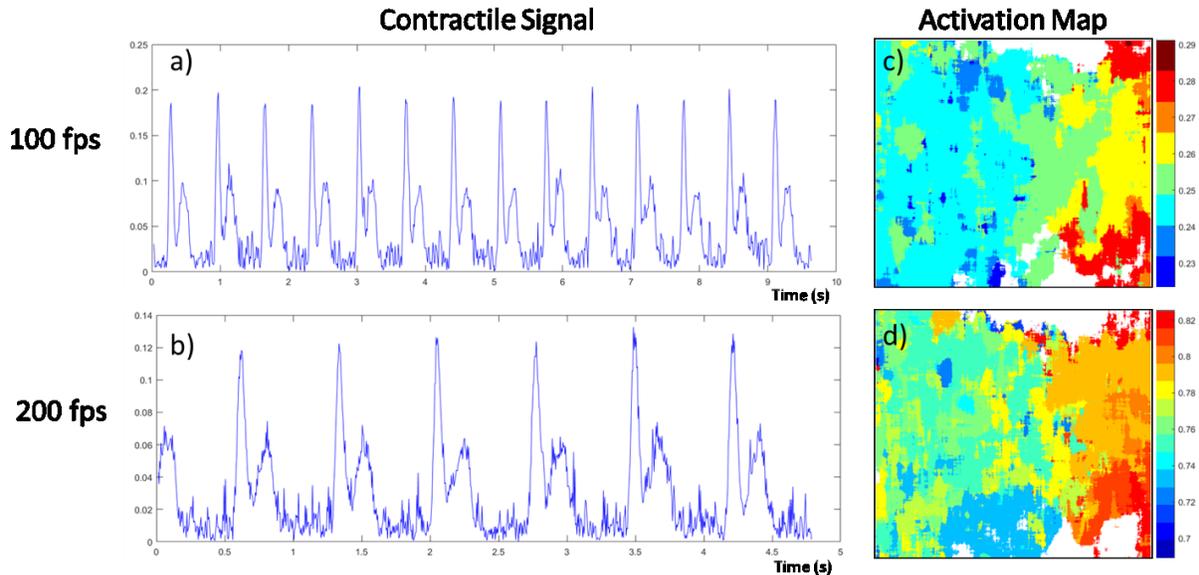


Figure 8 : Effect of speed of acquisition on contractile signal and activation map on the same neonatal rat cardiomyocyte tissue. a) and b) The contractile signal obtained from the video, at 100 and 200 fps respectively; c) and d) the activation maps obtained from the first beat of these videos. The contractile characteristics are the following respectively, beating frequency of 1.47hz and 1.39hz, time between peaks of 192ms and 186ms, relaxation to contraction ratio of 0.521 and 0.563.

why the frequency reduced for the second recording at 200 fps. As the beating rate is the same, using a higher sampling speed allows the contractile signal, more specifically the contraction peaks pair, to have twice as many data points, meaning a better time resolution. As an example, in figure 9b, we can observe a slight tilt of the relaxation peak towards the right whereas in 8a it is uncertain if it is not just due to noise. Additionally, this better time resolution permits the activation maps to have more time increments, as shown in figure 9c and 9d.

Electrical Stimulation

The electrical stimulation sub-unit has been tested separately with an oscilloscope and a 5 W resistance of 15 Ω , confirming the biphasic generation of stimulation pulses with tunable frequency, duration of pulse and amplitude through the main imaging unit. Once tested, cell cultures in wells containing electrodes were connected to the stimulation unit. In figure 10, three contractile signals are presented of NRCM tissue, initially without uniform tissue contraction.

In 9a, the tissue is connected to the stimulation sub-unit, but no pulses are generated resulting in a noisy signal without definite contraction peaks. The tissue has many areas contracting separately, which results in smaller and varying peaks. In figure 10b and 10c, electrical pulses of 1 Hz and 2 Hz frequency respectively are applied. The contraction period is equal to the stimulating period with a small difference of a few milliseconds.

Discussion

We proposed a novel imaging system for continuous evaluation of cardiac tissue, integrated with electrical stimulation and modifiable culture substrates. This stand-alone device is capable of imaging and recording videos of cardiomyocyte cultures, reaching acquisition speeds up to 300 fps and computing characteristic signal of the tissue contraction. The stimulation unit can generate a uniform contraction of the tissue enabling stimulation protocol that could allow further analysis of the tissue as well as long term stimulation protocols for cardiomyocyte maturation after differentiation. Activation maps, providing information on the ectopic origin and contraction propagation speed, are computed from the contractile signal. This imaging tool combines many important systems to allow a novel approach to evaluate and monitor cardiomyocyte cultures.

The purpose of this tool, in addition to being a cardiac tissue monitoring and evaluation tool, could be stem cell differentiation protocol optimisation. As an evaluation tool, the characteristic signal gives rapid insight of the contractile properties of the cells. This could be used to evaluate genetic mutations in cardiomyocytes derived from patients or induced mutations by transfection. Currently, methods such as patch clamp or microelectrode array (MEA) do not allow such quick and simple evaluation. Additionally, quick evaluation of contractile function, in combination with the possibility to run multiple experiments in parallel make this imaging system a promising tool for drug screening. In the optic of optimising cell cultures, real-time imaging systems allow the possibility to extract information, in this case contractile function, at any given time of the culture process. While the cardiac differentiation process is quite slow in

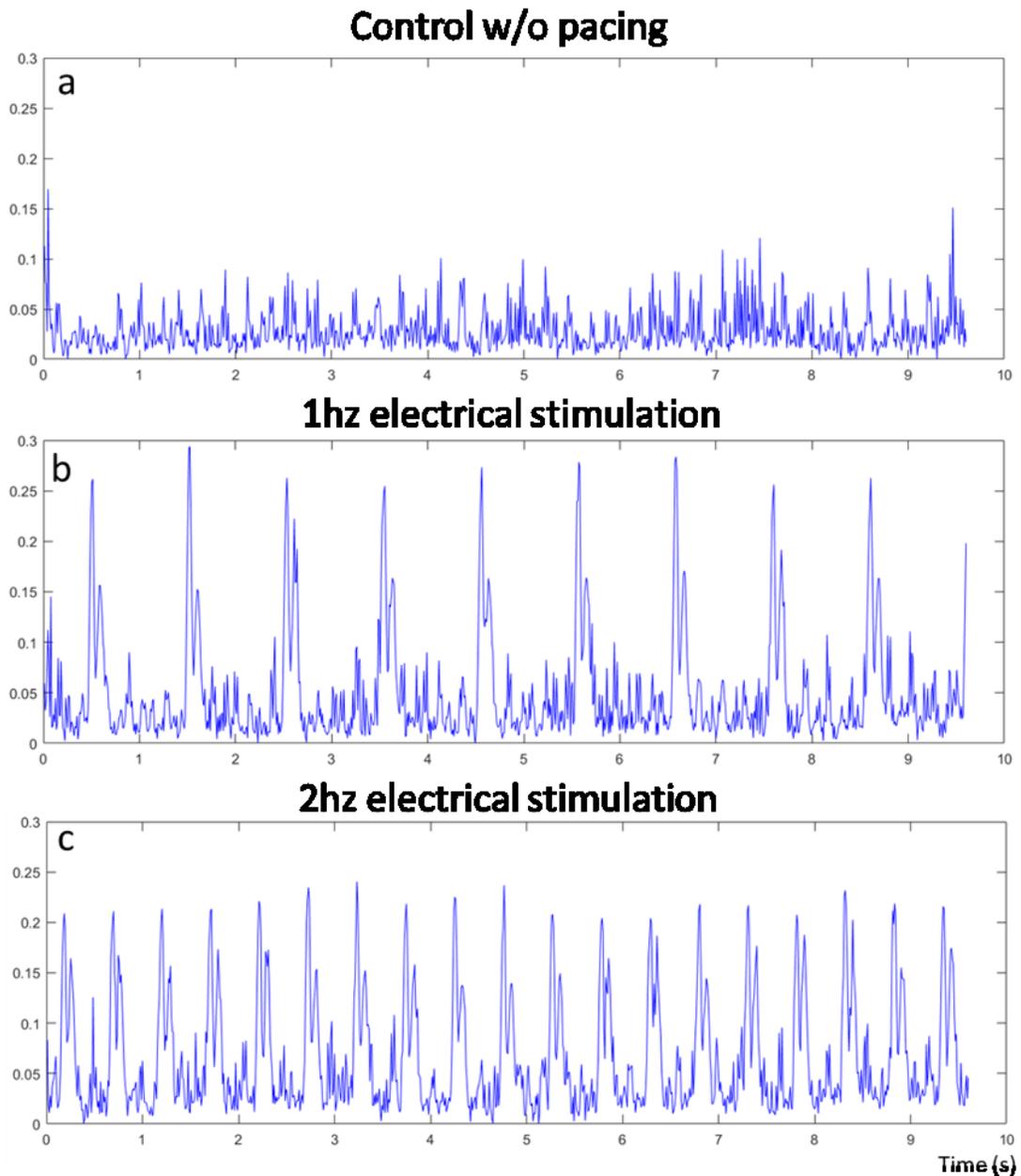


Figure 9 : Electrical stimulation validation, a) is the control composite signal obtained without electrical stimulation of the tissue, b) is the composite signal obtained during 1hz electrical stimulation of the tissue and c) is the composite signal obtained during 2hz electrical stimulation. The same sample has been used for all three acquisitions, each of 10s at 100fps. While no contractions were detected in the control signal, clear contraction-relaxation pairs can be observed in the electrically-stimulated signals. Respective contractile characteristics of these signals are the following: period of contraction of 1.01 and 0.508, time between peak-pairs of 0.079s and 0.077, and relative ratio of peak-pairs of 0.91 and 0.95.

comparison to an action potential, the imaging device can be used to follow slower cellular phenomenon, without impacting the cultures environment. To this intent, the device can be programmed to acquire 4 megapixels images at long intervals to follow the development of the tissue and its structural organisation. Once contraction would begin, faster acquisition could be acquired alternately. The contractile properties and the structural information could in turn be used to optimise current protocols or develop new techniques that could complement the current protocols used, such as electrical stimulation during cardiac differentiation.

Acquisition speed

As shown in the result section, higher acquisition speed is crucial to obtain reliable tissue contractile information. In the proposed system, the speed of acquisition reaches 300 fps, with a spatial resolution of 672 x 380 pixels and a pixel size of 8 μm . This spatial resolution allows the creation of more precise data of the rate of variation of the light intensity which is directly correlated to the contraction speed of the tissue. An average action potential, the phenomenon that induces calcium release leading to cellular contraction, would last about 200 ms depending on the beating frequency and is on average less than 250 ms in the case of human cardiomyocytes derived from stem cells (He et al. 2003). To be able to detect small variation in the contractile signal and correlate these changes with the action potential, the more data points available the better. For this reason, our prototype was designed to achieve high acquisition speeds, thus allowing up to 60 data points during a 200 ms action potential.

Additionally, for a culture area with a maximum length of 5.1 mm and a given speed of contraction propagation of 100 mm/s, the maximum time needed for the wave to travel from one end of the tissue to the other is 51 ms. The resolution of the activation maps produced, is limited by the acquisition speed of the system, in this case 300 fps. This results in a maximum resolution of 15 frames. In the case where the propagation is along the width of the culture area (3.1 mm), the maximum resolution drops down to 9 increments. However, if the acquisition speed is lower, for example 60 fps, the resolution would be only 3 frames along the longest direction, further demonstrating the need for a high-speed imaging device. The focal point could be inferred with higher precision using a method similar to the one published by Ponard *et al.* (Ponard, Kondratyev, and Kucera 2007).

Electrical stimulation potential

The rationale for having a modifiable and fully automated electrical stimulation subsystem comes from the need to create standardised evaluation protocols as well as from the reported benefits of long-term electrical stimulation of cardiomyocytes derived from stem cells.

In the first case, it is reasonable to think that the proposed contractile characteristics are highly impacted by the beating rate of the tissue as calcium transients and contractile dynamic are modified by the rate of electrical activation. For this reason, in order to have comparable results from one experiment to the next, the beating frequency needed to be controllable. However, the electrical stimulation at 2 Hz of a tissue already beating at a 1.9 Hz frequency compared to one beating at a 0.5Hz is not expected to have the same impact on the contractile properties and in turn the acquired characteristic signal. Additional data needs to be acquired to propose a proper evaluation protocol using the imaging system.

In the literature, experimental electrical stimulation protocols have already been reported. Long term electrical stimulation, for a period longer than 72 h for example, does not seem to affect cell viability, but enhances cell elongation, preserves contractile function, accelerates cardiomyocyte growth and increases their RNA accumulation (Au et al. 2007; Berger et al. 1994; Johnson et al. 1994).

Cardiomyocyte-like cells derived from stem cells have been shown to achieve a more mature phenotype with the use of a long-term electrical stimulation (Hirt et al. 2014; Chan et al. 2013; Ma et al. 2018). Hernández *et al.* have published that even single brief periods of electrical stimulation can promote cardiogenic potential of hiPSCs in terms of the number of beating EBs and gene expression of cardiac transcription factors and contractile muscle proteins (Hernández et al. 2016). By combining a continuous electrical stimulation with the proposed device, the goal is to allow monitoring of maturing tissues and its process, allowing a better understanding. As both acute and long-term seem to have a positive impact on cardiac cells, future work using the system could investigate the optimal electrical stimulation periods.

Stand-alone vs scalability

At the core of the system is the Jetson TK1, a stand-alone development card that has the NVIDIA Kepler GPU. The current software does not take advantage of this feature, i.e. parallel

programming, as most of the most demanding code, such as the calculation of the activation map, is being performed in post-processing. Having the potential to parallelize code and do heavy processing in real-time is a great feature that could be included in future development of the device. The Jetson TK1 can run as a stand-alone unit which is part of the reason why it was chosen for the system. It is also possible to have it run in remote access from a host computer running Ubuntu. This second option is interesting since it would allow multiple units to be controlled by the same machine and run experiments in parallel as multiple units could fit in a standard culture incubator. The scalability of the system is not dependent on having one host controlling multiple units, though the simplicity of this option is superior. Running multiple experiments in parallel is interesting especially while working on drug screening.

PDMS wells potential

Another way to run multiple experiments in parallel is the one presented in this work, which is to culture multiple wells at the same time and image each one within a short period of time. This technique limits the monitoring as there is no continuity of the image acquisition but allows many samples to be evaluated with the same imaging system. Each well is made from PDMS, a familiar low-cast biocompatible polymer. In addition to the capacity to control its rigidity, which in turn affects the efficiency and becoming of the stem cell cultures (Arshi et al. 2013), teams have shown the possibility to modify its surface to create micro grooves or patterns (Dahlmann et al. 2013; H. N. Kim et al. 2012). These structures impact cell organisation, promoting cell alignment if the micropattern groove are parallel for example, and allow for better reproduction of myocardial architecture and synchronized contraction (McDevitt et al. 2002). Using well patterning would make the cultures even more suited for drug screening and toxicity. Furthermore, having a modulable substrate, the imaging system reinforces its purpose as a tool for cardiac patch optimisation. In addition, using the same molds as presented in figure 3, one could also create culture wells out of different polymers with superior rigidity.

Device's purpose in the field

Cell based biosensors, more specifically digital movie analysis techniques, are promising for the cardiac tissue engineering field as they offer new ways to evaluate tissue function. The most used of these techniques is videomicroscopy, which has been used to evaluate cardiac tissue

since at least 1988, with the work by Eppenberger (Eppenberger et al. 1988). To our knowledge, while beating rate has been evaluated through digital movie analysis since 1990 (Rohr 1990), no other group has proposed easily evaluable contractile characteristics, while also integrating components specific to cardiomyocyte monitoring, such as electrical stimulation and real-time imaging. Videomicroscopy requires the use of fast acquisition cameras, mounted on optical setups which are not only costly but also, for most, not suitable for use in an incubator. It is advisable to use specialised culture chambers to keep the engineered tissue at the correct temperature and controlled CO₂ concentration to have reproducible results if the experiments are performed outside the incubator. Our system also includes a software that allows direct monitoring of contraction. To achieve the same results as with our proposed imaging system, one would have to buy and combine many different components, modifying an incubator to accept the camera, cool it, protect it from the high humidity, and develop its own software. An advantage of videomicroscopy over our current setup is its versatility on the acquisition speed and on the spatial resolution.

Other groups have previously proposed imaging techniques for lenseless cell monitoring (S. B. Kim et al. 2011; Zheng et al. 2011), which also provide a large field of view and simple optical setup. The system closest to ours was published by Kim *et al.*, and used a CMOS sensor from a commercially available webcam and a similar detection system, using light variation peaks as a marker of contraction. Their work allowed for beat detection and beat-to-beat variability measurements, though their system could only reach acquisition speeds of 29 fps and did not offer the possibility of high-resolution images. We believe that for cardiac monitoring, high acquisition speeds are a must since cellular contraction is a rapid phenomenon, especially if one is interested in other characteristics than bpm. However, their work has the advantage of being easier to reproduce as fewer components are required. Another group has proposed an imaging system also using a lenseless technique, subpixel perspective sweeping microscopy, achieving higher image resolution (Zheng et al. 2011). Using their system coined the ePetri, they imaged immortalised cell lines, embryonic stem cells, viral plaque and waterborne parasites, achieving a microscope quality (Zheng et al. 2011; S. A. Lee et al. 2014), (Han and Yang 2014). Although not stand-alone, their system allows to look at slow cellular phenomena and is meant to be used in the incubator. The main difference with our system is in the acquisition speed and the purpose

of the device, ours being focused on cardiomyocytes while theirs is for cells in general, which explains why our proposed system integrates other sub-systems and high acquisition speeds.

Conclusion

In summary, our system is specifically designed for cardiomyocyte monitoring and evaluation, allowing optimisation of future tissue engineering studies. Three different cell types were used to validate the system and all its functionalities, such as electrical stimulation, high-resolution image acquisition, high-speed video acquisition and computing of tissue contractile characteristics. Further investigation is required to determine either species specific markers in the contractile signal or standard characteristics, for the purpose of protocol optimisation, evaluation of mutations induced cardiomyocytes derived from iPSc, drug screening and cardiotoxicity.

Discussion Générale

Le projet de maîtrise ici présenté représente bien la complexité et les multiples disciplines du génie biomédical. Un dispositif d'imagerie spécialisé pour la culture de tissus cardiaques est présentement disponible dans le laboratoire de modélisation et d'instrumentation en génie tissulaire cardiaque de l'institut de cardiologie de Montréal, où la maîtrise a été réalisée. Celui-ci servira lors de l'optimisation des protocoles de création des feuillets de cellules cardiaques dans le but d'obtenir des *biopacemakers* fonctionnels. De plus, le laboratoire utilise maintenant des cardiomyocytes obtenus de cellules souches, selon le protocole mis en place lors du travail de maîtrise. Cette section servira à approfondir certains points mentionnés dans le chapitre 1 et la discussion de l'article (Chapitre 2), proposer d'autres avenues possibles avec les différentes fonctionnalités du dispositif et élaborer sur sa place dans le marché de l'évaluation de la cardiotoxicité. Malgré le succès du projet, certaines difficultés furent rencontrées et seront décrites ici afin de permettre à d'autres chercheurs d'apprendre de ces complications et démontrer la complexité du projet. Finalement, une suite du projet avec le dispositif sera proposée.

Optimisation du biopacemaker

Lors du mauvais fonctionnement du nœud sinusal ou du système de conduction, la thérapie actuelle privilégiée est l'implantation d'un pacemaker électrique. Néanmoins, la thérapie idéale serait de réparer le nœud sinusal ou le remplacer par un pacemaker biologique. Des approches moléculaires et cellulaires pour remplacer ces stimulateurs biologiques ont été testées sur des modèles animaux arythmiques (Rosen et al. 2004). Une des approches envisagées est la thérapie génique. Notamment, Edelberg *et al.* ont injecté dans les oreillettes de porcs un plasmide incorporant le gène codant pour le récepteur β 2-adrénergique, augmentant le rythme cardiaque par approximativement 40% (Edelberg, Aird, and Rosenberg 1998). Cependant, l'effet fut d'une courte durée, soit moins de 24h, et nécessitait la présence de cellules pacemakers fonctionnelles. Aussi, Miake *et al.* ont rapporté l'utilisation du transfert viral de gènes pour convertir les cellules musculaires cardiaques au repos en cellules pacemaker et la génération *in vivo* réussie chez un cochon d'Inde d'une activité électrique spontanée rythmée dans le ventricule (Miake, Marbán, and Nuss 2002).

L'avenue envisagé par notre laboratoire était, comme mentionné dans l'introduction, la création de feuillets de cellules cardiaques. L'optimisation de la fréquence et la stabilité de l'activité spontanée des *biopacemakers* est primordial à leur bon fonctionnement *in vivo*, puisque l'objectif est de reproduire les propriétés innées du nœud sinusal. Ceci est pourquoi l'objectif du projet était de fournir un outil permettant cette optimisation.

Stimulation Électrique

Dans la section résultats du chapitre 2, il était présenté que la contraction tissulaire suivait précisément la stimulation électrique. Dans la littérature, il a été démontré que le conditionnement électrique des cardiomyocytes dérivés de cellules souches humaines favorise la maturation des cardiomyocytes, modifie leur automaticité et augmente l'expression des connexines (Chan et al. 2013; Eng et al. 2016). De plus, les cardiomyocytes adaptent leur rythme d'activation autonome à la fréquence à laquelle ils sont stimulés, un effet induit par l'émergence d'une population de cellules rapidement dépolarisante et par le changement d'expression de hERG. Les expériences d'Eng *et al.* démontrent que l'expression de hERG augmente lorsque la fréquence de stimulation est plus élevée (Eng et al. 2016). Ce comportement adaptatif est durable et transférable aux cardiomyocytes environnants (Eng et al. 2016). Ainsi, le dispositif pourrait permettre la génération de feuillets aux fréquences modulables. Aussi, comme le dispositif permet une stimulation électrique par champ, qui entraîne une contraction uniforme du tissu, celui-ci ne permet pas d'évaluer la stabilité de l'origine ectopique simultanément à la stimulation électrique. Il serait ainsi nécessaire d'arrêter la stimulation électrique afin de pouvoir évaluer l'activité spontanée du tissu.

L'intérêt du système est qu'il sera possible d'évaluer en temps réel l'impact de la stimulation électrique à long terme sur la fréquence d'activation spontanée, sans aucun changement de l'environnement autre que la stimulation électrique. La durée, la fréquence et la longueur du pulse (impulsion) de stimulation optimale pourront ainsi être déterminées en plus du meilleur moment pour débiter la stimulation électrique lors de la différenciation en cardiomyocytes. Il sera possible d'observer la stabilité de la fréquence en fonction du temps de stimulation. Éventuellement, il serait intéressant d'évaluer la possibilité de « défibriller » les cultures dont l'activité spontanée est désorganisée afin de retrouver une contraction uniforme dans le tissu.

Bassins de culture

Le système d'imagerie bénéficie de bassins de culture ayant un substrat fait de PDMS. Comme mentionné dans le chapitre 2, ce polymère a une rigidité modulable selon le ratio de durcissant utilisé (Boudreau-Béland et al. 2015). L'intérêt de cette fonctionnalité réside dans l'interaction entre le substrat et la culture cellulaire. Dans la littérature, plusieurs études démontrent l'importance de l'effet de la rigidité du substrat de culture sur la fonction cellulaire.

Notamment, un substrat présentant une rigidité similaire à la rigidité cellulaire/tissulaire est le plus approprié pour optimiser la force de contraction des myocytes (Engler et al. 2004). Dans cette étude, des myoblastes ont été cultivés sur des bandes de collagène attachées à du verre ou des gels de polymère d'élasticité variée. Malgré la formation de myotubes peu importe le substrat, seulement ceux avec une rigidité typique d'un muscle normal, soit un module de Young d'environ 12 kPa, permettaient l'apparition d'une striation myosine/actine. Également, contrairement à la formation de sarcomères, la force d'adhésion augmente de façon monotone par rapport à la rigidité du substrat (Engler et al. 2004). Une autre étude a rapporté que le stress de contraction des cardiomyocytes dérivés de cellules souches augmentait avec la rigidité du substrat, tandis que la vitesse de contraction et la morphologie des cellules n'étaient pas directement liées aux effets de la contractilité sur le substrat (Hazeltine et al. 2012). Ils ont également démontré que la contractilité des cardiomyocytes dérivée de hPSCs réagit bien à l'isoprénaline et reste stable en culture pendant une période de 2 mois (Hazeltine et al. 2012). Hörning *et al.* ont quant à eux avancé que la conduction du myocarde est favorisée de manière significative lorsque la rigidité de l'environnement de culture cellulaire correspond à celle des cellules cardiaques, soit environ 4 kPa (Hörning et al. 2012). Une autre étude renchérit sur l'importance du substrat de culture en rapportant que les matrices imitant l'élasticité du microenvironnement de développement du myocarde sont optimales pour la transmission du travail contractile à la matrice et pour la promotion de la striation de l'actomyosine et du battement spontané à 1 Hz (Engler et al. 2008).

Ainsi, le contrôle de la rigidité du substrat, en plus de la possibilité de créer des microstructures, fournissent des outils à l'utilisateur du système pour optimiser les caractéristiques des cultures tissulaires qu'ils cherchent à créer. Dans le cadre du *biopacemaker*, il sera important d'utiliser un substrat avec une rigidité similaire à celle d'un tissu musculaire normal afin d'optimiser la

transmission de la contraction et sa conduction. Dans les cas où les types cellulaires s'ancrent difficilement sur le substrat, des bassins plus rigides devraient être utilisés afin de favoriser l'attachement cellulaire et ainsi la viabilité de la culture. Comme la période d'activation spontanée est dépendante de l'élasticité du substrat, c'est-à-dire que les cellules sur des matrices dures (>20 kPa) ont une fréquence moins élevée en plus de ralentir graduellement leur fréquence de battement sur une période de 48 heures (Engler et al. 2008), il sera important de ne pas dépasser 20 kPa comme rigidité du substrat.

Évaluation de la cardiotoxicité

La cardiotoxicité est une cause majeure d'attrition de futurs médicaments lors du développement préclinique (Mandenius et al. 2011). De plus, le risque d'arythmie induite est la cause la plus courante de restriction ou de retrait de médicaments du marché (Kannankeril and Roden 2007). Comme l'allongement de l'intervalle QT est une cause majeure de tachycardie ventriculaire, telle que des torsades de pointes, il est primordial que le potentiel d'un médicament d'induire cet effet soit évalué (Asakura et al. 2015). Le mécanisme électrophysiologique le plus courant de l'allongement de l'intervalle QT est essentiellement l'inhibition de la repolarisation ventriculaire. La repolarisation ventriculaire est contrôlée par divers courants potassiques, quoique le composant principal soit le canal potassique du redresseur retardé (*delayed rectifier potassium channel* - I_{Kr}) (Meyer et al. 2004). Les techniques classiques pour évaluer le prolongement de l'intervalle QT incluent le patch-clamp et les expériences utilisant un cœur entier tel le cœur de Langendorff. La technique de *patch-clamp* sur des cellules cardiaques natives est un moyen bien accepté d'étudier les paramètres du potentiel d'action cardiaque. Néanmoins, l'acquisition de données par cette technique est longue et nécessite un opérateur qualifié (Meyer et al. 2004). Le cœur en rétroperfusion Langendorff est une expérience très sophistiquée et fiable, mais coûte cher et prend beaucoup de temps (Meyer et al. 2004). Aujourd'hui, des biocapteurs à base de cellules ont été utilisés pour évaluer l'effet cardiotoxique des médicaments, notamment les matrices de microélectrodes (*microelectrode arrays* - MEA) (Offenhäusser and Knoll 2001).

Les biocapteurs à base de cellules utilisent des cellules vivantes comme éléments de détection pour examiner les réactifs biologiquement actifs et ont été largement appliqués au dépistage pharmacologique (S. B. Kim et al. 2011). Plusieurs types de biocapteurs à base de cellules ont

été développés pour les tests de cardiotoxicité, tels que l'analyse numérique de vidéos (Stummann et al. 2008), les MEAs (Asakura et al. 2015) et les capteurs potentiométriques adaptables à la lumière (*light addressable potentiometric sensors* - LAPS) (G. Xu et al. 2005). Les MEAs mesurent le potentiel électrique du champ extracellulaire grâce à ses canaux multiples. Bien que les MEAs puissent détecter les effets chronotropes (c'est-à-dire les changements anormaux du rythme cardiaque) causés par les médicaments en temps réel, ils sont limités par leur coût élevé ainsi que par leur petite surface de mesure définie par de minuscules électrodes (S. B. Kim et al. 2011). Les systèmes LAPS sont aussi capables de suivre les changements de rythme cardiaque en temps réel en évaluant le potentiel d'action extracellulaire d'une seule cellule vivante (G. Xu et al. 2005). Ils sont néanmoins limités par leur petite surface active de mesure, des procédures de fabrication compliquées pour le système de détecteur à semi-conducteurs intégrés et la difficulté de trouver une source lumineuse spécifique correspondante à la transition de bande d'énergie du détecteur (S. B. Kim et al. 2011). Il existe aussi l'évaluation de l'absorption d'oxygène cellulaire pour surveiller l'état des cardiomyocytes et la résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance* - SPR) pour évaluer la cardiotoxicité (Mandenius et al. 2011).

Le système d'imagerie développé lors de cette maîtrise est adapté des techniques d'analyse numérique de vidéo. Permettant le suivi en temps réel, il résout un de leur principal désavantage. Le signal caractéristique de la contraction obtenu à partir des variations de patrons cellulaires permet indirectement de suivre la durée du potentiel d'action puisque la contraction suit très étroitement celle-ci. Ainsi, le temps entre les deux pics, celui de contraction et celui de relaxation, permettrait d'évaluer si un médicament prolonge ou non l'intervalle QT. Le système permettrait ainsi d'évaluer rapidement l'effet cardiotoxique des médicaments, tout en ne présentant pas les limitations des MEAs, qui sont présentement beaucoup utilisés, notamment un faible coût de base et d'utilisation ainsi qu'une grande surface de mesure.

Protocole de différenciation

La méthodologie développée durant le projet de maîtrise concernant l'obtention de cardiomyocytes à partir de cellules souches est fonctionnel, puisqu'à multiple occasions des cultures de cellules souches embryonnaires de souris ont été différenciées en cardiomyocytes. Les étapes de pré-différenciation sont principalement dérivées d'un protocole élaboré par

Millipore (EMD Millipore 2018) et avaient préalablement été testées par des collaborateurs. Les étapes de différenciations, elles, sont adaptées du protocole du Dr. Kokkinopoulos. Dans le protocole original, deux lignées cellulaires de mESCs ont été utilisées pour obtenir des cardiomyocytes (Kokkinopoulos et al. 2016). Ceci porte à croire que le protocole ici présenté permettrait l'utilisation d'autres lignées cellulaires également, fournissant une certaine flexibilité quant au choix de cellules utilisées par le laboratoire. Cependant, une optimisation des concentrations, notamment celles d'Activine A et de BMP4, devrait être faite. En outre, au cours de l'induction mésodermiques les concentrations d'activine A et de BMP4 sont considérées critiques pour l'induction optimale mésodermique dans des conditions sans sérum (Kattman et al. 2011). Dans le présent protocole, leurs concentrations ont été prises directement du protocole original du Dr. Kokkinopoulos. Néanmoins, il serait intéressant de trouver les concentrations idéales pour la ligné cellulaire utilisé, soit E14TG2A, puisque le protocole original était optimisé pour une lignée cellulaire dérivée dans leur laboratoire, quoiqu'ils avaient vérifié le bon fonctionnement de ces concentrations avec la lignée utilisée dans le projet de maîtrise (Kokkinopoulos et al. 2016). À noter, une concentration supérieure d'Activine A de 8 ng/mL n'a pas augmenté l'efficacité de la différenciation, tandis qu'une dose plus élevée de BMP4 a tant qu'à elle inhibée de manière significative la différenciation en cardiomyocytes (Kokkinopoulos et al. 2016).

De plus, le protocole mis au point soumet la culture à moins de passages puisque que la différenciation se fait en monocouche et non par corps embryonnaires. Ceci permet de conserver la morphologie cellulaire tout en appliquant un stress cellulaire minimal. La trypsinisation endommage probablement les cellules en cours de différenciation et affecte leur viabilité (Kokkinopoulos et al. 2016). En effet, il a été démontré que les cellules soumises à un protocole de différenciation par monocouche, par rapport aux cellules dérivées de corps embryonnaires, ont une survie accrue après leur greffe dans des cœurs de rat qui ont subi un infarctus (Laflamme et al. 2007).

Le protocole utilisé permet d'obtenir des tissus dont la structure des sarcomères est striée en plus de présenter des zones de contraction, ce qui supporte la production de cardiomyocytes fonctionnels. Bien que les mesures électrophysiologiques aient montré le caractère des cardiomyocytes sur les cellules battantes dans le protocole de référence, il est difficile d'exclure le fait que ces cellules ne sont pas des cardiomyocytes adultes pleinement matures dans les

conditions actuelles (Kokkinopoulos et al. 2016). Tel que mentionné précédemment, la stimulation électrique permet la maturation cellulaire des cardiomyocytes dérivés de cellules souches. Le dispositif développé lors du projet de maîtrise permettrait de faire mûrir ces cellules et ainsi permettrait d'optimiser le protocole de différenciation.

Difficultés rencontrées

Le présent mémoire, plus particulièrement l'article retrouvé au Chapitre 2, ne permet pas de bien démontrer la complexité du code du système d'imagerie. Pour réaliser le programme final, plusieurs différentes bibliothèques de fonctions ont été apprises, telles qu'OpenCV, GTK et Gstreamer, bien que certaines n'ont même pas été utilisées. Cette section présentera certaines problématiques rencontrées par rapport à la programmation, la conception des bassins de PDMS et la réalisation du stimulateur électrique, afin de permettre l'appréciation du travail effectué pour leur réalisation.

Acquisition d'image

Le capteur d'image fut principalement choisi pour sa grande vitesse d'acquisition et sa haute résolution. Il venait cependant avec une documentation minimale et une application de base qui ne permettait pas les fonctionnalités désirées. Comme le fournisseur de la caméra ne partageait pas le code source de l'application de base permettant de l'utiliser, il fallut commencer par créer un programme pour extraire les images. La documentation de la compagnie pointait vers l'utilisation de OpenCV (Open Source Computer Vision, 2018), qui est une bibliothèque de fonctions de programmation principalement destinées à l'imagerie par ordinateur en temps réel. Toutefois, l'utilisation d'OpenCV devint problématique sur deux enjeux. Le premier, survenu au tout début, fut causé par les pilotes du capteur; Le format des images qu'ils produisaient n'était pas compatible avec OpenCV. Pour contourner cette problématique, le code source d'OpenCV fut modifié afin de définir le format utilisé et ainsi le rendre conforme. La librairie fut par la suite recompilée en utilisant le code source modifié.

Par la suite, il fut possible d'acquérir les images du capteur et de les faire afficher à l'écran. Avant de poursuivre et programmer les prochaines fonctionnalités, la priorité était de vérifier les différentes contraintes du projet, notamment la capacité à acquérir des images à haute vitesse. Les premiers tests effectués permettaient au mieux d'afficher une image aux dix millisecondes.

Comme les spécifications du capteur attestait un débit d'image aussi élevé que 330 images par seconde, le fournisseur de la caméra fut contacté et nous avons dû conclure qu'OpenCV n'était pas approprié pour notre projet. Ce n'est qu'après la réalisation du programme avec l'api V4L2 (LinuxTV, 2018) que le vrai problème fut découvert, soit que le temps d'exposition de la caméra était le facteur limitant dans la vitesse d'acquisition. Étant par défaut à 10 ms, il était évident que notre programme ne permettrait jamais un débit plus élevé que 100 images par seconde. Afin de modifier ces paramètres avec OpenCV il aurait soit fallu écrire une « *patch* » ou créer un code avec une autre librairie. Comme V4L2 permettait le contrôle des paramètres de la caméra, il fut tout simplement plus simple de continuer le programme avec celui-ci, la partie la plus complexe étant déjà terminée. Avec du recul, utiliser OpenCV aurait simplifié plusieurs aspects de la programmation du projet, notamment le traitement numérique des images et l'affichage. Cependant, l'utilisation de fonctions de « plus bas niveau » favorise une meilleure efficacité du code et une meilleure compréhension des mécanismes internes du code.

Bassins de culture

La conception des bassins de culture consistait en réalité à la conception des moules qui ont servi au coulage du PDMS. Les bassins devaient toutefois respecter certaines contraintes, notamment au niveau des dimensions. Ceux-ci devaient avoir un fond d'une épaisseur minimale et une largeur à peine plus grande que le capteur CMOS dû à l'architecture du PCB du capteur. Au lieu de créer un moule d'une pièce dont le centre serait légèrement plus bas que le contour, une mince couche de plastique d'une épaisseur de moins de 100 μm fût collée sur le dessus du moule pour en remonter le côté extérieur. Ceci avait pour effet de garder le centre lisse, produisant des bassins au fond clair et sans motifs. L'épaisseur du fond est ainsi la somme de l'épaisseur du papier et la colle, une épaisseur qui aurait été moindre avec l'utilisation seule de la CNC. Les contraintes de largeur ont fait en sorte que l'épaisseur des rebords des bassins soit faible, ce qui rendait la tâche du démoulage ardue. Comme plusieurs autres personnes allaient utiliser le dispositif, un moule en deux parties fût réalisé afin de simplifier le démoulage, voir figure 3. Ceci permettait également un meilleur rendement puisque beaucoup de bassins étaient endommagés lors de cette étape. Avec des bassins aux contours moins élevés, le premier modèle aurait été suffisant. À l'avenir lors de la création de moule, la facilité du démoulage devrait être prise en compte dès le début afin de sauver beaucoup de temps et de travail.

Circuit de stimulation électrique

Le circuit électrique présenté à la figure 4 fut le produit de plusieurs itérations de circuits. Une des contraintes du système était la stimulation biphasique afin d'éviter l'accumulation de charge pendant de longue période de stimulation électrique et une stimulation électrique optimale comparativement à une stimulation électrique monophasique (Chiu et al. 2011). Afin de fournir une différence de potentiel négative et positive, deux sources de courant furent premièrement utilisées. Rapidement, cette option fut considérée non viable puisqu'elle était encombrante et réduisait la portabilité du système. Un H-bridge commercial (DRI0002, DFRobot) pour le contrôle de moteur fut par la suite utilisé mais, malgré tous nos efforts, ne permettait pas le bon fonctionnement du système électrique. C'est ainsi que nous avons-nous même réalisé notre circuit à l'aide de transistors. Initialement, le Jetson TK1 servait de source de courant et de contrôleur direct du système. Cependant, une forte résonance électrique était introduite dans le circuit. Malgré le positionnement de condensateurs et résistances pour réduire cet effet en filtrant les fréquences problématiques, le circuit fut court-circuité et l'ensemble du système brulé. Comme le système électrique avait été testé avec un Arduino Uno (A000066, Arduino) et se comportait sans aucun problème avec celui-ci, la solution fut d'utiliser l'Arduino Uno comme intermédiaire entre le Jetson et le circuit électrique, tel que présenté dans l'article. L'Arduino Uno fournissait une source de courant beaucoup plus stable que le Jetson, et aucune résonance n'était observable à l'oscilloscope. L'utilisation de l'Arduino Uno ajoute cependant un câble électrique supplémentaire et augmente la taille du système. Le fait d'avoir un stimulateur électrique séparé peut aussi être un avantage, permettant à tout autre système pouvant communiquer par I2C de l'intégrer.

Continuité du projet

L'objectif principal du projet était le développement du système d'imagerie. Avec ce nouvel outil, le laboratoire pourra étudier de nouvelles avenues, telle que l'optimisation des feuillets *biopacemakers*. Pour en permettre un accès simplifié et permettre à d'autres laboratoires de l'utiliser, certaines améliorations pourraient être apportées, telle une interface graphique

rassemblant toutes les différentes fonctionnalités du système. Cette section présentera la suite du projet et les différents ajouts possibles futurs.

Interface graphique conviviale

Lors de la maîtrise, deux stagiaires ont travaillé sur un projet connexe au développement du système d'imagerie. Leur supervision m'a ainsi été confiée. Leur objectif était de créer une interface graphique simple pour le système d'imagerie. À l'été 2017, la première stagiaire a commencé par créer le squelette de l'interface, programmé en C en utilisant principalement l'API GTK3+. Elle a par la suite incorporé les fonctionnalités de création et d'analyse du signal caractéristique de la contraction à partir de vidéos préenregistrés, intégré la détection de pics de contraction et inclut l'affichage des vidéos. En 2018, la deuxième stagiaire a quant à elle intégré la lecture à partir du capteur et son affichage, la capture de photo, le contrôle de la caméra, un protocole d'imagerie à long terme et la génération d'un journal permettant de suivre les différentes tâches effectuées dans l'interface. Il reste cependant à optimiser le code et à rajouter les différentes fonctionnalités se rapportant au stimulateur électrique. Une fois ces tâches accomplies, cette interface pourra remplacer les différents programmes individuels détaillés dans l'article (chapitre 2) et permettre une utilisation simplifiée du dispositif.

Parallélisation de la surveillance

Afin de suivre en continue plusieurs expériences en parallèle, d'autres systèmes devront être assemblés. Ceci requerrait l'achat des différentes composantes électroniques présentées dans la méthodologie du chapitre 2 et leur assemblage. Le temps d'impression des boîtiers serait d'ailleurs le « goulot d'étranglement » dans ce processus, puisque l'assemblage est rapide, approximativement 4h, et l'importation des différents programmes quasi instantanée. Dans l'assemblage, le plus long est la réalisation du circuit de stimulation électrique qui comporte plusieurs éléments à souder. Chaque dispositif d'imagerie ainsi créé serait autonome, bien qu'avoir multiples écrans et claviers autour de l'incubateur ne serait pas optimal. Comme chaque système peut également être contrôlé à distance par Ethernet, l'approche optimale serait qu'un seul ordinateur soit en charge de l'ensemble des unités d'imagerie. Le code développé à ce jour permet de procéder ainsi, mais l'affichage en temps réel des images prend plus de temps qu'en mode autonome. Une optimisation du code serait ainsi de mise, voire même la création d'une

interface permettant d'alterner rapidement entre les différentes unités. L'interface réalisée par les stagiaires serait une bonne base pour sa création, cependant certaines fonctions devraient être revues.

Température interne du système

Une limitation actuelle du dispositif d'imagerie est l'intrusion d'humidité au cours d'une longue période de temps. Dans l'article, il est mentionné que le niveau d'humidité atteint 70% après quelques heures dans l'incubateur. Un haut taux d'humidité est problématique pour l'électronique, principalement à cause de dépôts d'oxydation qui peuvent entraîner des courts-circuits. Dans une telle situation, la réparation du circuit électrique est particulièrement ardue puisque déterminer l'emplacement du court-circuit est pénible, puisqu'aucune altération physique n'est visible. Également, utiliser de l'électronique dans un environnement chaud durant de très longues périodes de temps n'est pas recommandé, puisque certains composants risquent de surchauffer et ainsi moins bien performer ou encore s'endommager. Pour remédier à cette limitation, il serait intéressant de commander les pièces du boîtier dans un matériel complètement imperméable à l'humidité et permettant un bon transfert de chaleur avec l'extérieur du boîtier, tel l'aluminium. Alternativement, le boîtier pourrait être plus épais et fait d'un matériel isolant thermiquement. Il faudrait ainsi rajouter un système de refroidissement, tel un élément pelletier, et de contrôle de la température afin de dissiper la chaleur produite par le système électrique. Ces modifications permettraient au système de surveiller des cultures durant plusieurs jours sans compromettre son intégrité.

Autres améliorations possibles

Les contraintes et objectifs du projet, définis au début du travail de maîtrise, ont été rencontrés et un dispositif d'imagerie fonctionnel fut réalisé. Il était alors avantageux d'arrêter le développement du dispositif et de commencer différentes expériences l'utilisant, notamment en collaboration avec d'autres experts. Dans le futur, des stages pourraient être alloués à l'amélioration du système selon deux aspects : la programmation et l'architecture du système. La programmation des différentes fonctionnalités du système est principalement codée en C. Seulement le *post-processing* est présentement fait sur Matlab. Il serait avantageux que l'ensemble des fonctions s'y reliant puisse être réalisées sur le dispositif, notamment la création

des cartes d'activations. Ceci accélérerait l'évaluation des cultures et servirait de tremplin pour éventuellement les créer en temps réel. Le choix d'un module de développement, possédant une grande puissance en GPU, permettra une parallélisation de ces fonctions.

Le module de développement, le Jetson TK1, possède plusieurs fonctionnalités non utilisées par le dispositif d'imagerie. Afin d'offrir un produit optimisé et de plus petite taille, ce qui faciliterait son utilisation dans un incubateur, il serait possible de retravailler l'architecture des PCB du Jetson et du capteur d'image en travaillant de pair avec leurs fournisseurs afin de n'avoir que les éléments nécessaires.

Conclusion

L'objectif principal du projet de maîtrise ici présenté était la réalisation d'un système d'imagerie à haute vitesse pour évaluer en temps réel des cultures tissulaires cardiaques. En parallèle à la réalisation de ce projet de développement, un protocole pour obtenir des cardiomyocytes à partir de cellules souches embryonnaires de souris fut développé. Ce protocole permit l'obtention de plusieurs monocouches de cellules présentant de la contraction, en plus de l'amplification des cellules souches embryonnaires initiales, totalisant plus de 5×10^8 cellules souches congelées. Les monocouches obtenues via le protocole ne contractaient cependant pas de manière uniforme, mais plutôt par grappe ayant des fréquences de contraction distinctes. De plus, le chapitre 1 présente les connaissances de base par rapport aux cellules souches, plus spécifiquement les cellules embryonnaires, et les techniques de culture s'y rattachant. Cette revue permet une mise à niveau rapide pour les futurs étudiants du laboratoire afin qu'ils puissent continuer la culture de cellules souches.

Le système d'imagerie développé servira entre autres comme outil pour l'optimisation de feuillets cellulaires cardiaques, afin de créer des pacemakers biologiques. Pour se faire, celui-ci permet une acquisition d'image à un débit aussi élevé que 300 images par seconde. De ces images il est possible d'évaluer l'organisation tissulaire, en plus de réaliser des vidéos desquels un signal caractéristique de la contraction peut être produit. De ces vidéos, il est possible d'obtenir des cartes d'activation, permettant une estimation de la vitesse de propagation, ainsi que la détermination de l'origine focale de la contraction. Le système d'imagerie comporte également un système de stimulation électrique et des bassins de culture à rigidité modulable, fournissant d'autres outils pour l'évaluation et l'optimisation de cultures cellulaires cardiaques. Il reste cependant certaines améliorations possibles, notamment au niveau de l'intégration du *post-processing* sur le Jetson. En somme, le prototype développé lors de ce projet de maîtrise permet l'observation, l'évaluation des caractéristiques contractiles et la surveillance de cultures de cardiomyocytes, en plus de fournir un protocole de culture et différenciation de cellules souches. Ceci en fait un outil prometteur pour l'optimisation en génie tissulaire cardiaque.

Bibliographie

- Ali, Shah R., Simon Hippenmeyer, Lily V. Saadat, Liqun Luo, Irving L. Weissman, and Reza Ardehali. 2014. "Existing Cardiomyocytes Generate Cardiomyocytes at a Low Rate after Birth in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (24): 8850–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408233111>.
- Ambesh, Paurush, and Aditya Kapoor. 2017. "Biological Pacemakers: Concepts and Techniques." *The National Medical Journal of India* 30 (6): 324. <https://doi.org/10.4103/0970-258X.239072>.
- Amit, M., V. Margulets, H. Segev, K. Shariki, I. Laevsky, R. Coleman, and J. Itskovitz-Eldor. 2003. "Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells." *Biology of Reproduction* 68 (6): 2150–56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012583>.
- Arshi, Armin, Yasuhiro Nakashima, Haruko Nakano, Sarayoot Eaimkhong, Denis Evseenko, Jason Reed, Adam Z. Stieg, James K. Gimzewski, and Atsushi Nakano. 2013. "Rigid Microenvironments Promote Cardiac Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells." *Science and Technology of Advanced Materials* 14 (2). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/14/2/025003>.
- Asakura, Keiichi, Seiji Hayashi, Atsuko Ojima, Tomohiko Taniguchi, Norimasa Miyamoto, Chiaki Nakamori, Chiho Nagasawa, et al. 2015. "Improvement of Acquisition and Analysis Methods in Multi-Electrode Array Experiments with iPS Cell-Derived Cardiomyocytes." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Focused Issue on Safety Pharmacology, 75 (September): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.04.002>.
- Au, Hoi Ting H., Irene Cheng, Mohammad F. Chowdhury, and Milica Radisic. 2007. "Interactive Effects of Surface Topography and Pulsatile Electrical Field Stimulation on Orientation and Elongation of Fibroblasts and Cardiomyocytes." *Biomaterials* 28 (29): 4277–93. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.001>.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, and Robin Lovell-Badge. 2003. "Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function." *Genes & Development* 17 (1): 126–40. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>.
- Beltrami, Antonio P., Laura Barlucchi, Daniele Torella, Mathue Baker, Federica Limana, Stefano Chimenti, Hideko Kasahara, et al. 2003. "Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration." *Cell* 114 (6): 763–76.
- Benjamin, Emelia J., Michael J. Blaha, Stephanie E. Chiuve, Mary Cushman, Sandeep R. Das, Rajat Deo, Sarah D. de Ferranti, et al. 2017. "Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association." *Circulation* 135 (March). <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000485>.
- Berger, H. J., S. K. Prasad, A. J. Davidoff, D. Pimental, O. Ellingsen, J. D. Marsh, T. W. Smith, and R. A. Kelly. 1994. "Continual Electric Field Stimulation Preserves Contractile Function of Adult Ventricular Myocytes in Primary Culture." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 266 (1): H341–49. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.1.H341>.

- Berlo, Jop H. van, and Jeffery D. Molkenkin. 2014. "An Emerging Consensus on Cardiac Regeneration." *Nature Medicine* 20 (12): 1386–93. <https://doi.org/10.1038/nm.3764>.
- Bodas, Dhananjay, and Chantal Khan-Malek. 2007. "Hydrophilization and Hydrophobic Recovery of PDMS by Oxygen Plasma and Chemical treatment—An SEM Investigation." *Sensors and Actuators B: Chemical* 123 (1): 368–73. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.08.037>.
- Boudreau-Béland, Jonathan, James Elber Duverger, Estelle Petitjean, Ange Maguy, Jonathan Ledoux, and Philippe Comtois. 2015. "Spatiotemporal Stability of Neonatal Rat Cardiomyocyte Monolayers Spontaneous Activity Is Dependent on the Culture Substrate." *PLOS ONE* 10 (6): e0127977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127977>.
- Bouman, L. N., and H. J. Jongsma. 1986. "Structure and Function of the Sino-Atrial Node: A Review." *European Heart Journal* 7 (2): 94–104. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a062047>.
- Briggs, Robert, and Thomas J. King. 1952. "Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38 (5): 455–63.
- Bruzauskaite, Ieva, Daiva Bironaite, Edvardas Bagdonas, Vytenis Arvydas Skeberdis, Jaroslav Denkovskij, Tomas Tamulevicius, Valentinas Uvarovas, and Eiva Bernotiene. 2016. "Relevance of HCN2-Expressing Human Mesenchymal Stem Cells for the Generation of Biological Pacemakers." *Stem Cell Research & Therapy* 7 (1): 67. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0326-z>.
- Burridge, Paul W., David Anderson, Helen Priddle, Maria D. Barbadillo Muñoz, Sarah Chamberlain, Cinzia Allegrucci, Lorraine E. Young, and Chris Denning. 2007. "Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability." *Stem Cells* 25 (4): 929–38. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0598>.
- Chambers, Ian, Douglas Colby, Morag Robertson, Jennifer Nichols, Sonia Lee, Susan Tweedie, and Austin Smith. 2003. "Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells." *Cell* 113 (5): 643–55.
- Chambers, Ian, Jose Silva, Douglas Colby, Jennifer Nichols, Bianca Nijmeijer, Morag Robertson, Jan Vrana, Ken Jones, Lars Grotewold, and Austin Smith. 2007. "Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development." *Nature* 450 (7173): 1230–34. <https://doi.org/10.1038/nature06403>.
- Chan, Yau-Chi, Sherwin Ting, Yee-Ki Lee, Kwong-Man Ng, Jiao Zhang, Zi Chen, Chung-Wah Siu, Steve K. W. Oh, and Hung-Fat Tse. 2013. "Electrical Stimulation Promotes Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells." *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6 (6): 989–99. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9510-z>.
- Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J. Shlomchik. 2001. "Responses to Alloantigens and Transplant Rejection." *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27163/>.
- Chiu, Loraine L.Y., Rohin K. Iyer, John-Paul King, and Milica Radisic. 2011. "Biphasic Electrical Field Stimulation Aids in Tissue Engineering of Multicell-Type Cardiac

- Organoids.” *Tissue Engineering. Part A* 17 (11–12): 1465–77. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0244>.
- Chong, James J. H., Xiulan Yang, Creighton W. Don, Elina Minami, Yen-Wen Liu, Jill J. Weyers, William M. Mahoney, et al. 2014. “Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts.” *Nature* 510 (7504): 273–77. <https://doi.org/10.1038/nature13233>.
- Cole, R. J., R. G. Edwards, and J. Paul. 1966. “Cytodifferentiation and Embryogenesis in Cell Colonies and Tissue Cultures Derived from Ova and Blastocysts of the Rabbit.” *Developmental Biology* 13 (3): 385–407.
- Dahlmann, Julia, George Kensah, Henning Kempf, David Skvorc, Anke Gawol, David A. Elliott, Gerald Dräger, Robert Zweigerdt, Ulrich Martin, and Ina Gruh. 2013. “The Use of Agarose Microwells for Scalable Embryoid Body Formation and Cardiac Differentiation of Human and Murine Pluripotent Stem Cells.” *Biomaterials* 34 (10): 2463–71. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.024>.
- Dorshkind, Kenneth. 2002. “Multilineage Development from Adult Bone Marrow Cells.” *Nature Immunology* 3 (4): 311–14.
- Duverger, James Elber, Vincent Jacquemet, Alain Vinet, and Philippe Comtois. 2018. “In Silico Study of Multicellular Automaticity of Heterogeneous Cardiac Cell Monolayers: Effects of Automaticity Strength and Structural Linear Anisotropy.” *PLOS Computational Biology* 14 (3): e1005978. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005978>.
- Edelberg, J. M., W. C. Aird, and R. D. Rosenberg. 1998. “Enhancement of Murine Cardiac Chronotropy by the Molecular Transfer of the Human beta2 Adrenergic Receptor cDNA.” *The Journal of Clinical Investigation* 101 (2): 337–43. <https://doi.org/10.1172/JCI1330>.
- El Khoury Nabil, Mathieu Sophie, Marger Laurine, Ross Jenna, El Gebeily Gracia, Ethier Nathalie, and Fiset Céline. 2013. “Upregulation of the Hyperpolarization-Activated Current Increases Pacemaker Activity of the Sinoatrial Node and Heart Rate During Pregnancy in Mice.” *Circulation* 127 (20): 2009–20. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001689>.
- EMD Millipore. 2018. “Murine Embryonic Stem Cell Culture Procedures & Protocols.” https://www.emdmillipore.com/Web-PR-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201306.11421.
- Eng, George, Benjamin W. Lee, Lev Protas, Mark Gagliardi, Kristy Brown, Robert S. Kass, Gordon Keller, Richard B. Robinson, and Gordana Vunjak-Novakovic. 2016. “Autonomous Beating Rate Adaptation in Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.” *Nature Communications* 7 (January): 10312. <https://doi.org/10.1038/ncomms10312>.
- Engler, Adam J., Christine Carag-Krieger, Colin P. Johnson, Matthew Raab, Hsin-Yao Tang, David W. Speicher, Joseph W. Sanger, Jean M. Sanger, and Dennis E. Discher. 2008. “Embryonic Cardiomyocytes Beat Best on a Matrix with Heart-like Elasticity: Scar-like Rigidity Inhibits Beating.” *Journal of Cell Science* 121 (22): 3794–3802. <https://doi.org/10.1242/jcs.029678>.
- Engler, Adam J., Maureen A. Griffin, Shamik Sen, Carsten G. Bönnemann, H. Lee Sweeney, and Dennis E. Discher. 2004. “Myotubes Differentiate Optimally on Substrates with Tissue-like Stiffness: Pathological Implications for Soft or Stiff Microenvironments.” *J Cell Biol* 166 (6): 877–87. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405004>.

- Eppenberger, Monika E., Ingrid Hauser, Thomas Baechi, Marcus C. Schaub, Ulrich T. Brunner, Claude A. Dechesne, and Hans M. Eppenberger. 1988. "Immunocytochemical Analysis of the Regeneration of Myofibrils in Long-Term Cultures of Adult Cardiomyocytes of the Rat." *Developmental Biology* 130 (1): 1–15. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90408-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90408-3).
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292 (5819): 154–56.
- Gardner, R. L. 1968. "Mouse Chimeras Obtained by the Injection of Cells into the Blastocyst." *Nature* 220 (5167): 596–97.
- Gaskell, Terri, Mikael C. O. Englund, and Johan Hyllner. 2016. "Human Embryonic Stem Cells." In *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient*, edited by Gustav Steinhoff, 27–49. Springer International Publishing. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-27610-6_2.
- Gélinas, Roselle, Nabil El Khoury, Marie-A. Chaix, Claudine Beauchamp, Azadeh Alikashani, Nathalie Ethier, Gabrielle Boucher, et al. 2017. "Characterization of a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Model for the Study of Variant Pathogenicity: Validation of a KCNJ2 Mutation." *Circulation. Cardiovascular Genetics* 10 (5). <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.117.001755>.
- Ginis, Irene, Yongquan Luo, Takumi Miura, Scott Thies, Ralph Brandenberger, Sharon Gerech-Nir, Michal Amit, et al. 2004. "Differences between Human and Mouse Embryonic Stem Cells." *Developmental Biology* 269 (2): 360–80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.034>.
- Giudicessi, John R., and Michael J. Ackerman. 2012. "Potassium-Channel Mutations and Cardiac Arrhythmias—diagnosis and Therapy." *Nature Reviews Cardiology* 9 (6): 319–32. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.3>.
- Guhr, Anke, Andreas Kurtz, Kelley Friedgen, and Peter Löser. 2006. "Current State of Human Embryonic Stem Cell Research: An Overview of Cell Lines and Their Use in Experimental Work." *STEM CELLS* 24 (10): 2187–91. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0053>.
- Gurdon, J. B. 1962. "The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 10 (December): 622–40.
- Han, Chao, and Changhui Yang. 2014. "Viral Plaque Analysis on a Wide Field-of-View, Time-Lapse, on-Chip Imaging Platform." *The Analyst* 139 (15): 3727–34. <https://doi.org/10.1039/C3AN02323K>.
- Hazeltine, Laurie B., Chelsey S. Simmons, Max R. Salick, Xiaojun Lian, Mehmet G. Badur, Wenqing Han, Stephanie M. Delgado, et al. 2012. "Effects of Substrate Mechanics on Contractility of Cardiomyocytes Generated from Human Pluripotent Stem Cells." Research article. *International Journal of Cell Biology*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/508294>.
- He, Jia-Qiang, Yue Ma, Youngsook Lee, James A. Thomson, and Timothy J. Kamp. 2003. "Human Embryonic Stem Cells Develop Into Multiple Types of Cardiac Myocytes: Action Potential Characterization." *Circulation Research* 93 (1): 32–39. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000080317.92718.99>.
- Heins, Nico, Mikael C.O. Englund, Cecilia Sjöblom, Ulf Dahl, Anna Tonning, Christina Bergh, Anders Lindahl, Charles Hanson, and Henrik Semb. 2004. "Derivation,

- Characterization, and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells.” *STEM CELLS* 22 (3): 367–76. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-367>.
- Hernández, Damián, Rodney Millard, Priyadharshini Sivakumaran, Raymond C. B. Wong, Duncan E. Crombie, Alex W. Hewitt, Helena Liang, et al. 2016. “Electrical Stimulation Promotes Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Stem Cells International* 2016: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/1718041>.
- Hirt, Marc N., Jasper Boeddinghaus, Alice Mitchell, Sebastian Schaaf, Christian Börnchen, Christian Müller, Herbert Schulz, et al. 2014. “Functional Improvement and Maturation of Rat and Human Engineered Heart Tissue by Chronic Electrical Stimulation.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 74 (Supplement C): 151–61. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.009>.
- Ho, Shirley S., Dominique Brossard, and Dietram A. Scheufele. 2008. “Effects of Value Predispositions, Mass Media Use, and Knowledge on Public Attitudes Toward Embryonic Stem Cell Research.” *International Journal of Public Opinion Research* 20 (2): 171–92. <https://doi.org/10.1093/ijpor/edn017>.
- Holden, Constance. 2002. “Primate Parthenotes Yield Stem Cells.” *Science* 295 (5556): 779–80. <https://doi.org/10.1126/science.295.5556.779a>.
- Hörning, Marcel, Satoru Kidoaki, Takahito Kawano, and Kenichi Yoshikawa. 2012. “Rigidity Matching between Cells and the Extracellular Matrix Leads to the Stabilization of Cardiac Conduction.” *Biophysical Journal* 102 (3): 379–87. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.018>.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, and N. Benvenisty. 2000. “Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Compromising the Three Embryonic Germ Layers.” *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 6 (2): 88–95.
- Jing, Donghui, Abhirath Parikh, and Emmanuel S. Tzanakakis. 2010. “Cardiac Cell Generation From Encapsulated Embryonic Stem Cells in Static and Scalable Culture Systems.” *Cell Transplantation* 19 (11): 1397–1412. <https://doi.org/10.3727/096368910X513955>.
- Johnson, T. B., R. L. Kent, B. A. Bubolz, and P. J. McDermott. 1994. “Electrical Stimulation of Contractile Activity Accelerates Growth of Cultured Neonatal Cardiocytes.” *Circulation Research* 74 (3): 448–59.
- Kaji, Keisuke, Katherine Norrby, Agnieszka Paca, Maria Mileikovsky, Paria Mohseni, and Knut Woltjen. 2009. “Virus-Free Induction of Pluripotency and Subsequent Excision of Reprogramming Factors.” *Nature* 458 (7239): 771–75. <https://doi.org/10.1038/nature07864>.
- Kannankeril, Prince J., and Dan M. Roden. 2007. “Drug-Induced Long QT and Torsade de Pointes: Recent Advances.” *Current Opinion in Cardiology* 22 (1): 39–43. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e32801129eb>.
- Karakikes, Ioannis, Grant D. Senyei, Jens Hansen, Chi-Wing Kong, Evren U. Azeloglu, Francesca Stillitano, Deborah K. Lieu, et al. 2014. “Small Molecule-Mediated Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Toward Ventricular Cardiomyocytes.” *STEM CELLS Translational Medicine* 3 (1): 18–31. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0110>.
- Kattman, Steven J., Alec D. Witty, Mark Gagliardi, Nicole C. Dubois, Maryam Niapour, Akitsu Hotta, James Ellis, and Gordon Keller. 2011. “Stage-Specific Optimization of Activin/Nodal and BMP Signaling Promotes Cardiac Differentiation of Mouse and

- Human Pluripotent Stem Cell Lines.” *Cell Stem Cell* 8 (2): 228–40. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.008>.
- Kawamura, Masashi, Shigeru Miyagawa, Kenji Miki, Atsuhiko Saito, Satsuki Fukushima, Takahiro Higuchi, Takuji Kawamura, et al. 2012. “Feasibility, Safety, and Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model.” *Circulation* 126 (11 Suppl 1): S29-37. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084343>.
- Kehat, Izhak, Dorit Kenyagin-Karsenti, Mirit Snir, Hana Segev, Michal Amit, Amira Gepstein, Erella Livne, Ofer Binah, Joseph Itskovitz-Eldor, and Lior Gepstein. 2001. “Human Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Myocytes with Structural and Functional Properties of Cardiomyocytes.” *Journal of Clinical Investigation* 108 (3): 407–14. <https://doi.org/10.1172/JCI12131>.
- Kim, Hee Sun, Sun Kyung Oh, Yong Bin Park, Hee Jin Ahn, Ki Cheong Sung, Moon Joo Kang, Lim Andrew Lee, et al. 2005. “Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells.” *STEM CELLS* 23 (9): 1228–33. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0296>.
- Kim, Hong Nam, Do-Hyun Kang, Min Sung Kim, Alex Jiao, Deok-Ho Kim, and Kahp-Yang Suh. 2012. “Patterning Methods for Polymers in Cell and Tissue Engineering.” *Annals of Biomedical Engineering* 40 (6): 1339–55. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0510-y>.
- Kim, Sang Bok, Hojae Bae, Jae Min Cha, Sang Jun Moon, Mehmet R. Dokmeci, Donald M. Cropek, and Ali Khademhosseini. 2011. “A Cell-Based Biosensor for Real-Time Detection of Cardiotoxicity Using Lensfree Imaging.” *Lab on a Chip* 11 (10): 1801. <https://doi.org/10.1039/c1lc20098d>.
- Kiviniemi, Mikko S., Markku A. Pirnes, H. Jaakko K. Eränen, Raimo V. J. Kettunen, and Juha E. K. Hartikainen. 1999. “Complications Related to Permanent Pacemaker Therapy.” *Pacing and Clinical Electrophysiology* 22 (5): 711–20. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1999.tb00534.x>.
- Klimanskaya, Irina, Young Chung, Sandy Becker, Shi-Jiang Lu, and Robert Lanza. 2006. “Human Embryonic Stem Cell Lines Derived from Single Blastomeres.” *Nature* 444 (7118): 481–85. <https://doi.org/10.1038/nature05142>.
- Knoepfler, Paul. 2013. *Stem Cells: An Insider’s Guide*. World Scientific.
- Kokkinopoulos, Ioannis, Hidekazu Ishida, Rie Saba, Steven Coppen, Ken Suzuki, and Kenta Yashiro. 2016. “Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells Using a Simple and Defined Protocol: Simple High-Yield Cardiomyogenesis Protocol.” *Developmental Dynamics* 245 (2): 157–65. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24366>.
- Laflamme, Michael A, Kent Y Chen, Anna V Naumova, Veronica Muskheli, James A Fugate, Sarah K Dupras, Hans Reinecke, et al. 2007. “Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells in pro-Survival Factors Enhance Function of Infarcted Rat Hearts.” *Nature Biotechnology* 25 (9): 1015–24. <https://doi.org/10.1038/nbt1327>.
- Landry, Donald W., and Howard A. Zucker. 2004. “Embryonic Death and the Creation of Human Embryonic Stem Cells.” *The Journal of Clinical Investigation* 114 (9): 1184–86. <https://doi.org/10.1172/JCI23065>.
- Lee, Jessamine Ng, Xingyu Jiang, Declan Ryan, and George M. Whitesides. 2004. “Compatibility of Mammalian Cells on Surfaces of Poly(dimethylsiloxane).” *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 20 (26): 11684–91. <https://doi.org/10.1021/la048562+>.

- Lee, Seung Ah, Jessey Erath, Guoan Zheng, Xiaoze Ou, Phil Willems, Daniel Eichinger, Ana Rodriguez, and Changhui Yang. 2014. "Imaging and Identification of Waterborne Parasites Using a Chip-Scale Microscope." Edited by Irene Georgakoudi. *PLoS ONE* 9 (2): e89712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089712>.
- Lerou, Paul H., Akiko Yabuuchi, Hongguang Huo, Ayumu Takeuchi, Jessica Shea, Tina Cimini, Tan A. Ince, Elizabeth Ginsburg, Catherine Racowsky, and George Q. Daley. 2008. "Human Embryonic Stem Cell Derivation from Poor-Quality Embryos." *Nature Biotechnology* 26 (2): 212–14. <https://doi.org/10.1038/nbt1378>.
- Lian, Xiaojun, Cheston Hsiao, Gisela Wilson, Kexian Zhu, Laurie B. Hazeltine, Samira M. Azarin, Kunil K. Raval, Jianhua Zhang, Timothy J. Kamp, and Sean P. Palecek. 2012. "Robust Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells via Temporal Modulation of Canonical Wnt Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (27): E1848–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200250109>.
- Liu, Kuancan, Baoshun Lin, Meng Zhao, Xiangyue Yang, Min Chen, Anding Gao, Fei Liu, Jianwen Que, and Xiaopeng Lan. 2013. "The Multiple Roles for Sox2 in Stem Cell Maintenance and Tumorigenesis." *Cellular Signalling* 25 (5): 1264–71. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.02.013>.
- Löser, Peter, Jacqueline Schirm, Anke Guhr, Anna M Wobus, and Andreas Kurtz. 2010. "Human Embryonic Stem Cell Lines and Their Use in International Research." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (2): 240–46. <https://doi.org/10.1002/stem.286>.
- Ma, Ruilian, Jialiang Liang, Wei Huang, Linlin Guo, Wenfeng Cai, Lei Wang, Christian Paul, Huang-Tian Yang, Ha Won Kim, and Yigang Wang. 2018. "Electrical Stimulation Enhances Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells for Myocardial Infarction Therapy." *Antioxidants & Redox Signaling* 28 (5): 371–84. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6766>.
- Mandenius, Carl-Fredrik, Daniella Steel, Fozia Noor, Thomas Meyer, Elmar Heinzle, Julia Asp, Sarina Arain, et al. 2011. "Cardiotoxicity Testing Using Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes and State-of-the-Art Bioanalytics: A Review." *Journal of Applied Toxicology* 31 (3): 191–205. <https://doi.org/10.1002/jat.1663>.
- Martin, G. R. 1981. "Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7634–38.
- Mascetti, Victoria L., and Roger A. Pedersen. 2016. "Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency." *Cell Stem Cell* 18 (1): 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.017>.
- McDevitt, Todd C., John C. Angello, Marsha L. Whitney, Hans Reinecke, Stephen D. Hauschka, Charles E. Murry, and Patrick S. Stayton. 2002. "In Vitro Generation of Differentiated Cardiac Myofibers on Micropatterned Laminin Surfaces." *Journal of Biomedical Materials Research* 60 (3): 472–79. <https://doi.org/10.1002/jbm.1292>.
- Meyer, Thomas, Karl-Heinz Boven, Elke Günther, and Michael Fejtl. 2004. "Micro-Electrode Arrays in Cardiac Safety Pharmacology." *Drug Safety* 27 (11): 763–72. <https://doi.org/10.2165/00002018-200427110-00002>.
- Miake, Junichiro, Eduardo Marbán, and H. Bradley Nuss. 2002. "Gene Therapy: Biological Pacemaker Created by Gene Transfer." *Nature* 419 (6903): 132–33. <https://doi.org/10.1038/419132b>.

- Mohr, Jeffrey C., Jianhua Zhang, Samira M. Azarin, Andrew G. Soerens, Juan J. de Pablo, James A. Thomson, Gary E. Lyons, Sean P. Palecek, and Timothy J. Kamp. 2010. "The Microwell Control of Embryoid Body Size in Order to Regulate Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells." *Biomaterials* 31 (7): 1885–93. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.033>.
- Morrison, Sean J., and David T. Scadden. 2014. "The Bone Marrow Niche for Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 505 (7483): 327–34. <https://doi.org/10.1038/nature12984>.
- Mummery, C. 2003. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells." *Circulation* 107 (>21): 2733–40. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000068356.38592.68>.
- Navarrete, Enrique G., Ping Liang, Feng Lan, Verónica Sanchez-Freire, Chelsey Simmons, Tingyu Gong, Arun Sharma, et al. 2013. "Screening Adverse Drug-Induced Arrhythmia Events Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Low-Impedance Microelectrode Arrays." *Circulation* 128 (11 0 1). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000570>.
- Nichols, Jennifer, Branko Zevnik, Konstantinos Anastassiadis, Hitoshi Niwa, Daniela Klewe-Nebenius, Ian Chambers, Hans Schöler, and Austin Smith. 1998. "Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4." *Cell* 95 (3): 379–91. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9).
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A. G. Smith. 2000. "Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-Renewal of ES Cells." *Nature Genetics* 24 (4): 372–76. <https://doi.org/10.1038/74199>.
- Noiseux, Nicolas, Guillaume Marquis-Gravel, Samer Mansour, Uswa Shahzad, Duncan J. Stewart, and Terrence M. Yau. 2014. "The Current State of Stem Cell Therapeutics: Canadian Approaches in the International Context." *Canadian Journal of Cardiology* 30 (11): 1361–69. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.04.031>.
- Offenhäusser, Andreas, and Wolfgang Knoll. 2001. "Cell-Transistor Hybrid Systems and Their Potential Applications." *Trends in Biotechnology* 19 (2): 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01544-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01544-4).
- Oransky, Ivan, and Adam Marcus. 2018. "Harvard and the Brigham Call for 31 Retractions of Cardiac Stem Cell Research." STAT. October 14, 2018. <https://www.statnews.com/2018/10/14/harvard-brigham-retractions-stem-cell/>.
- Ozcan, Aydogan, and Euan McLeod. 2016. "Lensless Imaging and Sensing." *Annual Review of Biomedical Engineering* 18 (1): 77–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092515-010849>.
- Ponard, Julien G. C., Aleksandar A. Kondratyev, and Jan P. Kucera. 2007. "Mechanisms of Intrinsic Beating Variability in Cardiac Cell Cultures and Model Pacemaker Networks." *Biophysical Journal* 92 (10): 3734–52. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091892>.
- Prowse, Andrew B. J., Nicholas E. Timmins, Terrence M. Yau, Ren-Ke Li, Richard D. Weisel, Gordon Keller, and Peter W. Zandstra. 2014. "Transforming the Promise of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to a Therapy: Challenges and Solutions for Clinical Trials." *Canadian Journal of Cardiology* 30 (11): 1335–49. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.08.005>.
- Rao, Mahendra. 2004. "Conserved and Divergent Paths That Regulate Self-Renewal in Mouse and Human Embryonic Stem Cells." *Developmental Biology* 275 (2): 269–86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.013>.

- Richards, Mark, Chui-Yee Fong, Woon-Khiong Chan, Peng-Cheang Wong, and Ariff Bongso. 2002. "Human Feeders Support Prolonged Undifferentiated Growth of Human Inner Cell Masses and Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 20 (9): 933–36. <https://doi.org/10.1038/nbt726>.
- Rodriguez, Ryan T., J. Matthew Velkey, Carolyn Lutzko, Rina Seerke, Donald B. Kohn, K. Sue O'Shea, and Meri T. Firpo. 2007. "Manipulation of OCT4 Levels in Human Embryonic Stem Cells Results in Induction of Differential Cell Types." *Experimental Biology and Medicine* 232 (10): 1368–80. <https://doi.org/10.3181/0703-RM-63>.
- Rohr, S. 1990. "A Computerized Device for Long-Term Measurements of the Contraction Frequency of Cultured Rat Heart Cells under Stable Incubating Conditions." *Pflügers Archiv* 416 (1): 201–6. <https://doi.org/10.1007/BF00370243>.
- Rosen, Michael R., Peter R. Brink, Ira S. Cohen, and Richard B. Robinson. 2004. "Genes, Stem Cells and Biological Pacemakers." *Cardiovascular Research* 64 (1): 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.012>.
- Sato, Noboru, Laurent Meijer, Leandros Skaltsounis, Paul Greengard, and Ali H. Brivanlou. 2004. "Maintenance of Pluripotency in Human and Mouse Embryonic Stem Cells through Activation of Wnt Signaling by a Pharmacological GSK-3-Specific Inhibitor." *Nature Medicine* 10 (1): 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>.
- Schnerch, Angelique, Chantal Cerdan, and Mickie Bhatia. 2010. "Distinguishing between Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Regulation: The Best Laid Plans of Mice and Men." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (3): 419–30. <https://doi.org/10.1002/stem.298>.
- Schuldiner, Maya, Ofra Yanuka, Joseph Itskovitz-Eldor, Douglas A. Melton, and Nissim Benvenisty. 2000. "Effects of Eight Growth Factors on the Differentiation of Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (21): 11307–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11307>.
- Segers, Vincent F. M., and Richard T. Lee. 2008. "Stem-Cell Therapy for Cardiac Disease." *Nature* 451 (February): 937–42. <https://doi.org/10.1038/nature06800>.
- Sell, S., and G. B. Pierce. 1994. "Maturation Arrest of Stem Cell Differentiation Is a Common Pathway for the Cellular Origin of Teratocarcinomas and Epithelial Cancers." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 70 (1): 6–22.
- Sell, Stewart, ed. 2003. *Stem Cells Handbook*. 2004 edition. Totowa, N.J: Humana Press.
- Senyo, Samuel E., Matthew L. Steinhauser, Christie L. Pizzimenti, Vicky K. Yang, Lei Cai, Mei Wang, Ting-Di Wu, Jean-Luc Guerquin-Kern, Claude P. Lechene, and Richard T. Lee. 2013. "Mammalian Heart Renewal by Pre-Existing Cardiomyocytes." *Nature* 493 (7432): 433–36. <https://doi.org/10.1038/nature11682>.
- Sharma, Arun, Guang Li, Kuppusamy Rajarajan, Ryoko Hamaguchi, Paul W. Burridge, and Sean M. Wu. 2015. "Derivation of Highly Purified Cardiomyocytes from Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Small Molecule-Modulated Differentiation and Subsequent Glucose Starvation." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 97 (March). <https://doi.org/10.3791/52628>.
- Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai. 2001. "Stem Cells Find Their Niche." *Nature* 414 (6859): 98–104. <https://doi.org/10.1038/35102160>.
- Stevanovic, M., O. Zuffardi, J. Collignon, R. Lovell-Badge, and P. Goodfellow. 1994. "The cDNA Sequence and Chromosomal Location of the Human SOX2 Gene." *Mammalian Genome* 5 (10): 640–42. <https://doi.org/10.1007/BF00411460>.

- Stevens, Leroy C. 1970. "The Development of Transplantable Teratocarcinomas from Intratesticular Grafts of Pre- and Postimplantation Mouse Embryos." *Developmental Biology* 21 (3): 364–82. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(70\)90130-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(70)90130-2).
- Strelchenko, Nick, Oleg Verlinsky, Valeri Kukharenko, and Yury Verlinsky. 2004. "Morula-Derived Human Embryonic Stem Cells." *Reproductive Biomedicine Online* 9 (6): 623–29.
- Stummann, Tina C., Mateusz Wronski, Tomasz Sobanski, Benjamin Kumpfmüller, Lars Hareng, Susanne Bremer, and Maurice P. Whelan. 2008. "Digital Movie Analysis for Quantification of Beating Frequencies, Chronotropic Effects, and Beating Areas in Cardiomyocyte Cultures." *Assay and Drug Development Technologies* 6 (3): 375–85. <https://doi.org/10.1089/adt.2008.129>.
- Surani, M. A. 2001. "Reprogramming of Genome Function through Epigenetic Inheritance." *Nature* 414 (6859): 122–28. <https://doi.org/10.1038/35102186>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell* 131 (5): 861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Talkhabi, Mahmood, Nasser Aghdami, and Hossein Baharvand. 2016. "Human Cardiomyocyte Generation from Pluripotent Stem Cells: A State-of-Art." *Life Sciences* 145 (January): 98–113. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.023>.
- Thomas, E. Donnall. 1999. "A History of Haemopoietic Cell Transplantation." *British Journal of Haematology* 105 (2): 330–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01337.x>.
- Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffrey M. Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391): 1145–47. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
- Tran, Thanh H., Xiurong Wang, Carol Browne, Yunyu Zhang, Martina Schinke, Seigo Izumo, and Mark Burcin. 2009. "Wnt3a-Induced Mesoderm Formation and Cardiomyogenesis in Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cells* 27 (8): 1869–78. <https://doi.org/10.1002/stem.95>.
- Unger, Christian, Heli Skottman, Pontus Blomberg, M. Sirac Dilber, and Outi Hovatta. 2008. "Good Manufacturing Practice and Clinical-Grade Human Embryonic Stem Cell Lines." *Human Molecular Genetics* 17 (R1): R48–53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn079>.
- Watanabe, Kiichi, Morio Ueno, Daisuke Kamiya, Ayaka Nishiyama, Michiru Matsumura, Takafumi Wataya, Jun B Takahashi, et al. 2007. "A ROCK Inhibitor Permits Survival of Dissociated Human Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 25 (6): 681–86. <https://doi.org/10.1038/nbt1310>.
- Wilmot, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. Campbell. 1997. "Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells." *Nature* 385 (6619): 810–13. <https://doi.org/10.1038/385810a0>.
- World Health Organisation. 2017. "Cardiovascular Diseases (CVDs)." May 17, 2017. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>.

- Wu, San-pin, Chiang-Min Cheng, Rainer B. Lanz, Tiannan Wang, Jonathan L. Respress, Sameer Ather, Wen Chen, et al. 2013. "Atrial Identity Is Determined by a COUP-TFII Regulatory Network." *Developmental Cell* 25 (4): 417–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.04.017>.
- Xiao, Lei, Xuan Yuan, and Saul J. Sharkis. 2006. "Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells." *STEM CELLS* 24 (6): 1476–86. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0299>.
- Xu, Gaixia, Xuesong Ye, Lifeng Qin, Ying Xu, Yan Li, Rong Li, and Ping Wang. 2005. "Cell-Based Biosensors Based on Light-Addressable Potentiometric Sensors for Single Cell Monitoring." *Biosensors and Bioelectronics* 20 (9): 1757–63. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.06.037>.
- Xu, Xiu Qin, Ralph Graichen, Set Yen Soo, Thavamalar Balakrishnan, Siti Norfiza Bte Rahmat, Shirly Sieh, Su Chin Tham, et al. 2008. "Chemically Defined Medium Supporting Cardiomyocyte Differentiation of Human Embryonic Stem Cells." *Differentiation* 76 (9): 958–70. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00284.x>.
- Zheng, Guoan, Seung Ah Lee, Yaron Antebi, Michael B. Elowitz, and Changhuei Yang. 2011. "The ePetri Dish, an on-Chip Cell Imaging Platform Based on Subpixel Perspective Sweeping Microscopy (SPSM)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (41): 16889–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110681108>.
- Zhu, Wei-Zhong, Benjamin Van Biber, and Michael A. Laflamme. 2011. "Methods for the Derivation and Use of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 767: 419–31. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_31.
- Zweigerdt, R., M. Burg, E. Willbold, H. F. Abts, and M. Ruediger. 2003. "Generation of Confluent Cardiomyocyte Monolayers Derived from Embryonic Stem Cells in Suspension: A Cell Source for New Therapies and Screening Strategies." *Cytotherapy* 5 (5): 399–413. <https://doi.org/10.1080/14653240310003062>.