



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : "Sciences de la Vie et de la Santé"

par Juan Pablo MAUREIRA

Traitement de l'Infarctus du Myocarde Chronique : Contribution des Cellules Souches Mésenchymateuses de Moelle Osseuse Autologue.

Membres du Jury :

<i>Rapporteurs:</i>	M. Pascal LEPRINCE	PU-PH - Université Paris VI, France
	M. Juan-Carlos CHACHQUES	Professeur - Université Paris V, France
<i>Examineurs</i>	M. Tony LAHOUTTE	Professeur - Universitair Ziekenhuis Brussel, Belgique
	M. Jean-Pierre VILLEMOT	PU-PH - Université de Lorraine, France
<i>Directeur de Thèse</i>	M. Pierre-Yves MARIE	PU-PH - Université de Lorraine, France
<i>Co-directeur</i>	M. Nguyen TRAN	MCU - Université de Lorraine, France

Résumé

La thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire constituent de nouvelles stratégies à évaluer dans le traitement de la cardiopathie ischémique. Dans le cas particulier de l'infarctus chronique (IDMc), la possibilité de réhabiliter une zone cicatricielle à partir de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse (CSMs), ainsi que la potentialité de remodeler l'architecture ventriculaire pariétale, sont particulièrement discutées.

La première partie est un rappel des principaux concepts à l'origine des espoirs fondés sur ces nouvelles voies thérapeutiques. Dans la deuxième partie, nous présentons nos travaux concernant (1) l'injection cellulaire myocardique directe par voie épicaudique chez le rat et chez l'homme souffrant d'IDMc et (2) l'application chirurgicale épicaudique directe chez le rat IDMc, d'un patch tissulaire fabriqué à l'aide de CSMs incluses dans un réseau de collagène de type I. Les résultats montrent que l'injection cellulaire directe est responsable d'une réaction inflammatoire immédiate non spécifique. Néanmoins, ces travaux soutiennent aussi que (1) les CSMs stimulent l'angiogénèse locale en fonction de l'activité métabolique résiduelle et (2) le patch de CSMs favorise le remodelage ventriculaire inverse chez les rats infarctés.

Dans la dernière partie, nous revenons, d'une manière plus générale, sur ces résultats qui restent encore trop limités pour espérer soigner une défaillance myocardique sévère. Néanmoins, bien que ces expériences ne confirment pas la potentialité cardiogénique des CSMs, elles suggèrent fortement la possibilité, par ces méthodologies, d'inverser le cours naturel de l'IDMc.

Mots-Clés : Thérapie cellulaire cardiaque, Ingénierie tissulaire cardiaque, Infarctus du myocarde chronique, Chirurgie cardiaque expérimentale, Cellules souche mésenchymateuse.

Abstract

Title : Treatment of chronic myocardial infarction: Impact of the bone marrow autologous mesenchymal stem cells

Cellular therapy and tissue engineering are new strategies to be tested in the treatment of ischemic cardiopathy. In chronic infarction (MI) specifically, the possibility of rehabilitating a cicatricial zone using bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) as well as the feasibility of remodeling parietal ventricular architecture are especially discussed.

The first part reviews the main concepts which have led to these new promising avenues of treatment. In the second part we present our work concerning (1) direct myocardial cellular injection via the epicardium in rats and in humans suffering from MI, and (2) direct epicardial surgical application of a tissular patch consisting of BMSC in a type I collagen network.

The results show that direct cellular injection is responsible for an immediate non-specific inflammatory reaction. Nevertheless, the work also supports the notions that (1) BMSCs stimulate local angiogenesis on the basis of residual metabolic activity, and (2) the BMSC patch stimulates inverse ventricular remodeling in infarcted rats.

The final part is devoted to a wider discussion of these results which are as yet too limited to hope to heal severe myocardial failure. However, despite the fact that these experiments do not confirm the cardiogenic potential of BMSCs, they do strongly hint at the possibility of using this methodology to invert the natural course of MI.

Keywords: Cardiac cellular therapy, Cardiac tissular engineering, Chronic myocardial infarction, Experimental heart surgery, Mesenchymal stem cell.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	5
Première partie : CONCEPTS GENERAUX.....	8
I. ISCHEMIE MYOCARDIQUE, INFARCTUS CHRONIQUE ET REMODELAGE VENTRICULAIRE	9
1. Sidération, hibernation et ischémie chronique.....	11
2. Infarctus aigu	14
3. Infarctus chronique et conséquences macroscopiques.....	16
4. Conséquences cellulaires de l'infarctus.....	18
5. Conséquences interstitielles de l'infarctus	21
6. Vascularisation : impact macro et micro circulatoire de l'infarctus du myocarde.....	22
7. Impact de la cardiopathie ischémique sur la fonction ventriculaire.....	25
II. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE MOELLE OSSEUSE	27
1. Définition et réservoir	27
2. Plasticité et potentiel cardio-vasculaire.....	28
3. CSM et facteurs paracrines	30
4. Immunogénécité et immunomodulation des CSM	32
5. Résistance à l'hypoxie et à la privation de glucose	32
III. LE CONCEPT DE LESION/REPARATION AU NIVEAU MYOCARDIQUE	34
1. Embryogénèse cardiaque: le modèle originel.	35
2. Des cellules souches dans le cœur adulte	38
3. Cytokines, facteurs de croissances, chémokines dans la cardiopathie ischémique et rôle dans le homing cardiaque.....	39
4. La CSM: des propriétés uniques mais une candidate parmi tant d'autres.....	42
5. Réparation chirurgicale: de la réparation macroscopique à l'ingénierie tissulaire.....	45
6. Des données expérimentales prometteuses et des données cliniques rassurantes.	48

Deuxième partie: TRAVAUX REALISES	54
I. ETUDE DE LA PERFUSION MYOCARDIQUE CHEZ LE RAT APRES TRANSPLANTATION EPICARDIQUE DE CSM (Article 1).....	55
II. THERAPIE CELLULAIRE DANS L'INFARCTUS CHRONIQUE CHEZ L'HOMME: RESULTATS CLINIQUES (Article 2).....	56
III. TRAITEMENT DE L'INFARCTUS CHRONIQUE DU MYOCARDE PAR UN PATCH REALISE A PARTIR DE CSM AUTOLOGUES CHEZ LE RAT (Article 3).....	57
 Troisième partie: DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION	58
I. DISCUSSION	59
1 .Choix de la méthodologie concernant l'implantation du patch de CSM	60
2. Critiques concernant le suivi des CSM dans la réparation tissulaire	64
3. Hypothèses concernant la contribution du patch de CSM dans la réparation tissulaire cardiaque	65
II. PERSPECTIVES A COURT TERME	70
III. THERAPIE CELLULAIRE VERSUS COEUR ARTIFICIEL MECANIQUE: BIO- IMITATION OU CYBER-MEDECINE?	71
IV. CONCLUSION	74
BIBLIOGRAPHIE	75

PREAMBULE

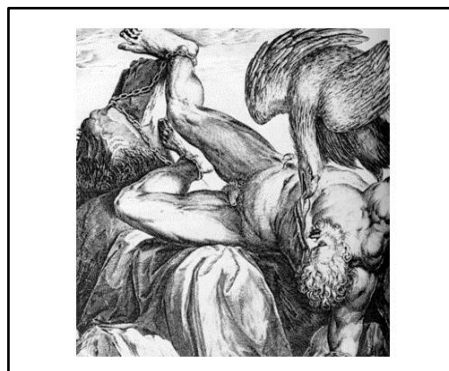
Depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, le traitement de la cardiopathie ischémique est devenu un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale¹⁻³. Cette maladie, si répandue mais jamais attendue, est intimement liée à la survenue et à la progression de l'*infarctus du myocarde*. Entité à la fois grave et ordinaire, elle désigne elle-même une large variété de situations cliniques très différentes. Pourtant, elle résume bien à elle-seule, une situation physiopathologique constante et permanente : *la mort post-hypoxique du cardiomyocyte*³. Cette dégénérescence biologique, au bout de quelques semaines, conduit alors inéluctablement au remplacement du tissu mobile privé de sang, par celui aride et passif de la cicatrice fibreuse. Le rappel de cette histoire naturelle, défavorable sous bien des égards, ne doit cependant pas, ici, nous faire passer sous silence les formidables progrès de l'organisation de la filière de soin, de la pharmacopée, de la cardiologie interventionnelle et de la chirurgie cardiaque dans la prise en charge de la cardiopathie ischémique ; elles ont déjà largement contribué et restent encore aujourd'hui les fers de lance thérapeutiques qui permettent de réduire, au fil du temps, la mortalité post-ischémique en routine clinique^{4, 5}.

Néanmoins, force est de constater, qu'exceptée la transplantation cardiaque, aucune thérapeutique n'a jusqu'à présent permis d'effacer ou tout du moins d'atténuer significativement la signature histologique de la nécrose myocardique et avec elle son cortège d'effets cliniques délétères. Dès lors, les nouvelles stratégies thérapeutiques, telles que la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire cardiaque ont focalisé notre intention depuis maintenant plus d'une dizaine d'années grâce aux énormes espoirs qu'elles portent en elles⁶⁻⁹. Que nous puissions imaginer la rénovation d'un tissu cardiaque contractile pérenne constituent à nos yeux une authentique source de motivation : la régénération organique du mythe prométhéen s'appliquerait-elle enfin au cœur déchu ?

La recherche des mécanismes impliqués dans le remodelage ventriculaire et la découverte permanente des potentialités du « *matériel cellulaire* », nous permettent d'envisager avec optimisme l'avenir de ces nouvelles thérapeutiques. Cependant, pour le médecin et son patient, l'épreuve du feu est la seule qui tienne, et cela éclaire en partie l'organisation de notre travail dans lequel nous concéderons volontairement une place prépondérante aux résultats pré-cliniques et cliniques. En effet, depuis la parution de résultats expérimentaux spectaculaires concernant la réhabilitation d'une zone d'infarctus aigu grâce à la transplantation *in situ* de

cellules souches⁸, nous avons voulu renouveler l'expérience dans notre laboratoire en nous intéressant, pour notre part, aux *situations hypoxiques chroniques*. Cette investigation a d'abord débuté par la transplantation intramyocardique de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) autologues d'origine médullaire en pleine zone cicatricielle fibreuse chez le petit puis chez le gros animal. Les résultats histologiques et fonctionnels furent initialement encourageants¹⁰⁻¹² et ce sont eux qui nous enthousiasmèrent et nous conduisirent à proposer une stratégie thérapeutique similaire applicable directement chez l'homme. Nous incluons donc dans nos travaux de recherche ces résultats cliniques riches d'enseignement qui présentent, au minimum, l'intérêt de mettre en exergue quelques unes des limites de cette approche¹³. Parallèlement, conscient de notre éloignement considérable d'une *réparation ad integrum* du myocarde malade, nous avons expérimenté diverses stratégies dérivées dont l'objectif ultime restait, cependant, toujours le même : favoriser le « *remodelage inverse* » du myocarde infarci.

Dans le travail qui suit, nous proposons de rappeler quelques uns des fondements théoriques concernant la thérapie cellulaire cardiaque à l'aide des CSMs au sens large puis nous présentons nos travaux à la fois sur leur versant clinique, comme nous l'avons déjà mentionné, et sur leur versant expérimental qui constitue encore aujourd'hui l'essentiel de notre approche. Nous avons, plus particulièrement, conçu un véritable « patch tissulaire » réalisé à partir de CSMs autologues organisées dans une matrice de collagène puis nous l'avons directement greffé sur le myocarde infarci chronique du rat. A la lueur d'une littérature de plus en plus abondante mais non moins contradictoire, nous commentons nos observations et nous proposons un modèle explicatif des bénéfices thérapeutiques que nous cherchons à démontrer chez le petit animal. Nous finissons par la présentation de nos orientations expérimentales actuelles qui pourrons, nous l'espérons, servir de fondement à de nouveaux traitements applicables prochainement chez l'homme.



Première partie : CONCEPTS GENERAUX

I. ISCHEMIE MYOCARDIQUE, INFARCTUS CHRONIQUE ET REMODELAGE VENTRICULAIRE

Les artères coronaires transportent du sang riche en oxygène et en nutriments vers le myocarde permettant ainsi le fonctionnement continu de la pompe cardiaque¹⁴⁻¹⁷. Cette même pompe contractile génère la pression et le débit coronaire indispensable à la pérennité du déroulement du cycle cardiaque¹⁸. A l'effort, la demande périphérique s'accroît et nécessite donc une adaptation de la pompe myocardique¹⁹. L'accroissement du travail myocardique est intimement lié à l'augmentation du débit coronaire qui s'adapte en partie grâce à la *vasomotricité* du réseau cardiaque artériolaire et à *l'adaptation des échanges microcirculatoires*^{17, 20}. Par convention, nous décrivons ces situations comme "normales" ou encore "physiologiques" (état cardiaque basal et/ou à l'exercice). L'*ischémie myocardique* regroupe, elle, l'ensemble des phénomènes survenant dès que la perfusion ne permet plus de subvenir à la demande métabolique « physiologique » tissulaire (Figure 1). Les conséquences de l'hypoperfusion myocardique constituent donc un vaste éventail de réponses qui dépendent de la durée et de l'intensité de l'ischémie mais aussi des mécanismes tissulaires préexistants pouvant moduler l'adaptation à la situation pathologique.

Brièvement, rappelons que la survenue de l'ischémie induit une hétérogénéité de la perfusion des couches myocardiques (dépendant du territoire coronaire atteint, de son anatomie, de ses suppléances macro et microcirculatoires, etc.) (Figure 2). Cette inadéquation entraîne tôt ou tard un dysfonctionnement initialement endocardique puis épocardique et enfin la dysfonction devient transmurale. Ces observations sont, entre autres, corrélées à la nature microcirculatoire et surtout à l'activité myofibrillaire correspondante. La couche sous-endocardique, constituée de fibres longitudinales relativement pauvres en récepteurs β , paraît en effet plus sensible à l'ischémie, occasionnant une dysfonction précoce de la relaxation tissulaire (dysfonctionnement diastolique). La dysfonction de la couche sous-épocardique, plus riche en fibres circulaires et en récepteurs β , aggrave cette situation entraînant une altération de la contraction tissulaire (dysfonctionnement systolique) qui s'aggrave davantage en cas d'atteinte transmurale (atteintes de l'ensemble des couches myofibrillaires)^{21, 22}. Les conséquences cellulaires et tissulaires corrélées à ces observations suivent des séquences graduelles et complexes qui correspondent chacune à des stades et à des évolutions différentes de la cardiopathie ischémique. *D'emblée, nous émettons donc l'hypothèse que l'impact*

thérapeutique de la thérapie cellulaire sera fonction du type de cardiopathie ischémique traitée si bien que la détermination précise du stade ischémique doit être un paramètre indispensable dans l'analyse qui suit toute expérimentation dans ce domaine. Aussi, bien que nous annonçons clairement nous intéresser, dans ce travail, au stade ultime de l'ischémie myocardique signifié par l'infarctus du myocarde chronique, il nous semble utile de rappeler brièvement d'une part les principaux stades de l'ischémie myocardique et d'autre part les principales conséquences cellulaires et tissulaires qui définissent le statut d'infarctus du myocarde chronique. Dans la suite de notre travail, nous assimilerons cette dénomination à celle de « *nécrose myocardique* », dénomination souvent utilisée en pratique clinique, bien que reflétant, elle aussi, des situations bien souvent hétérogènes.

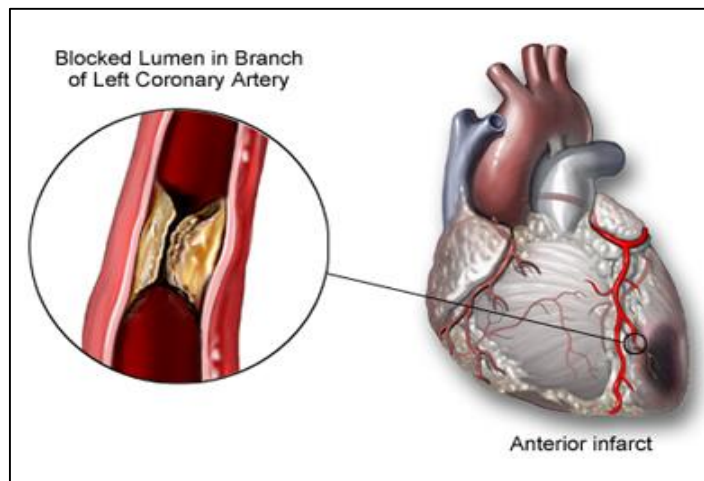


Figure 1: L'athérome, première étiologie de l'ischémie myocardique.

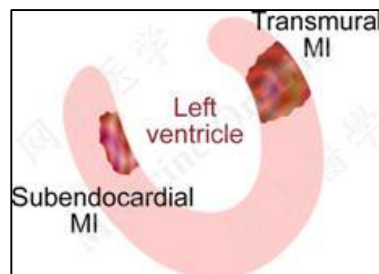


Figure 2 : Schématisation de l'atteinte ischémique des couches myocardiques.

1. Sidération, hibernation et ischémie chronique.

Le myocarde ventriculaire consomme en moyenne environ 8 mL d'oxygène pour 100 mL de muscle par minute²³ (ce qui nécessite en moyenne un débit coronaire d'environ 250mL/min chez l'adulte). Mais seulement environ 15% de ce volume sont nécessaires à la survie cardiomyocytaire, les 85% restants constituant l'apport nécessaire à la transformation énergétique cellulaire en contraction myofibrillaire. Un cardiomyocyte vivant n'est donc pas forcément un cardiomyocyte « contractile » et nous avons appris que sa « fonctionnalité » est étroitement liée au débit coronaire. Au repos, le débit coronaire peut souvent suffire au fonctionnement cardiomyocytaire même en cas de sténose athéromateuse marquée (angiographiquement supérieure à 50%)^{24, 25}. A l'effort, si la réserve de débit coronaire est insuffisante (autrement dit une diminution du ratio entre le débit coronaire maximal et le débit coronaire basal), l'ischémie tissulaire devient alors patente pour des sténoses coronariennes qui pouvaient être parfaitement "silencieuses" au repos.

Les observations expérimentales et cliniques nous ont appris que parfois, immédiatement après la survenue d'une ischémie aiguë provisoire, la fonction contractile ventriculaire peut rester altérée quelques heures voire quelques jours alors même que l'ischémie est corrigée (par rétablissement d'un débit coronaire "normal") : c'est ce phénomène qui est communément appelé « *sidération myocardique* »²⁶ (Figure 3). De façon similaire, les observations cliniques et chirurgicales post-pontages coronariens ont mis à jour le concept d'"*hibernation myocardique*": ce terme désigne un tissu myocardique non infarcté qui recouvre une fonctionnalité normale (en particulier du point de vue contractile) après revascularisation chirurgicale ou endoluminale²⁷, c'est-à-dire après le rétablissement d'un flux coronaire sanguin "utile".

Ces deux phénomènes semblent assez proches du point de vue physiopathologique puisqu'ils résultent de la réduction significative du débit coronaire (basal ou non) et que dans les deux cas, ces situations traduisent donc l'existence de situations réversibles par la restauration d'un débit coronaire adéquat. *Par définition, elles ne correspondent donc pas à des lésions histologiques majeures et irréversibles contrairement aux lésions d'infarctus* comme nous l'évoquerons plus loin. Néanmoins, quelques modifications morphologiques ont pu être

observées dans le tissu hibernant concernant les cardiomyocytes (diminution du nombre absolu, diminution des myofilaments contractiles, dégénérescence du cytosquelette, réduction de la taille des mitochondries, modification de la distribution de l'hétérochromatine dans le noyau, apoptose) mais aussi dans le tissu interstitiel (débris cellulaires, présence accrue de macrophages, de fibroblastes et de collagène)²⁸.

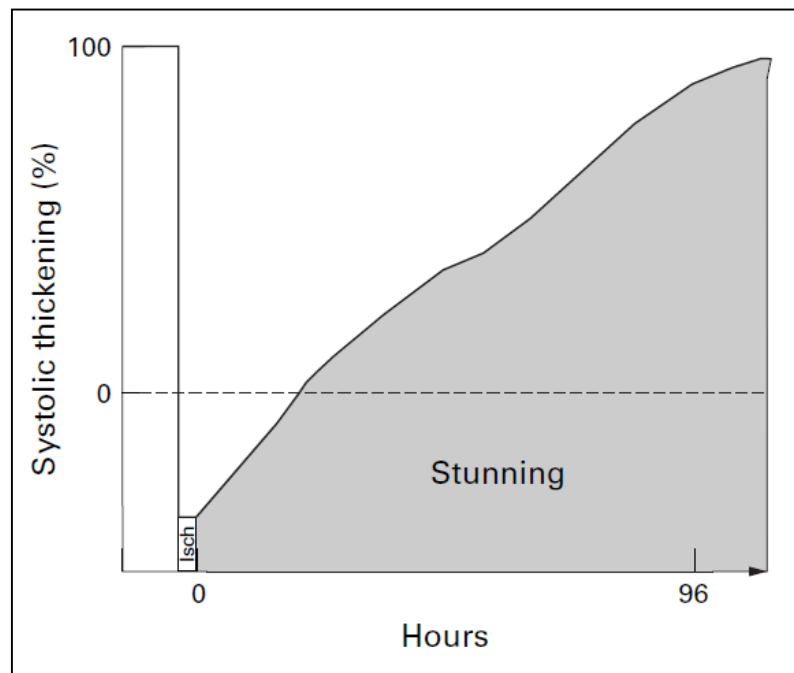


Figure 3 : Illustration de l'effet d'une brève occlusion coronaire (Hour ou heure 0) sur la fonction systolique chez le chien d'après Bolli et al.²⁹. Après normalisation du débit coronaire, la fonction systolique se normalise en quelques heures: cette période de dysfonction myocardique correspond à la phase de "sidération myocardique".

Ces notions sont d'une importance cruciale en clinique routinière puisqu'en découle, en grande partie, les indications de revascularisation myocardique qui n'ont de sens que si elles visent une amélioration fonctionnelle du patient. *Par convention, du myocarde "sidéré" ou "hibernant" est du myocarde viable* (sous-entendu, capable de pouvoir retrouver une fonction contractile). De même, nous désignons par le terme "myocarde ischémié" ou "myocarde ischémié" un myocarde souffrant d'ischémie aiguë ou chronique par inadaptation du débit coronaire mais sans préjuger de l'atteinte fonctionnelle. En d'autres termes, par habitude, le

terme "ischémie" ne préjuge en rien à lui seul de la viabilité du myocarde. La viabilité est, par simplification, régulièrement utilisée comme un paramètre purement qualitatif, alors qu'il désigne en réalité une quantité corrélée à l'activité métabolique des cardiomyocytes. Il est donc fondamental, en pratique clinique, d'étudier la « viabilité » du myocarde pour en déterminer le degré d'atteinte. En routine, cette viabilité est étudiée selon diverses techniques dont les plus fréquemment utilisées sont *l'échographie de stress à la dobutamine*, la *scintigraphie myocardique au Thallium 201 ou au Technétium 99- Sestamibi* et depuis plus récemment *l'IRM* et le *PET-scan* (^{18}F FDG-PET) (Figure 4). Dans notre laboratoire, nous avons plus particulièrement développé l'utilisation de la tomoscintigraphie myocardique chez le petit animal³⁰. Le sestamibi est une molécule lipophile dont l'intégration intracellulaire requiert une fonction mitochondriale intacte et une qualité membranaire préservée. Comparé au Thallium 201, le Technetium99-Sestamibi émet des photons à plus haute énergie et améliore ainsi la résolution de l'image³¹. L'acquisition des données synchronisées sur la contraction myocardique (gated-SPECT) permet d'étudier en plus de la viabilité, la fonction ventriculaire gauche globale et régionale. La réserve coronaire s'analyse grâce à l'étude myocardique au repos et à l'effort. La description de cette méthodologie appliquée au petit animal a déjà fait l'objet de plusieurs publications par le laboratoire qui m'a accueilli.

Table 1 Simplified classification system for flow-metabolism patterns in ^{18}F -fluorodeoxyglucose-positron emission tomography myocardial viability studies (see text for details)

Perfusion	Glucose metabolism	Category
Preserved	Preserved	(Viable)
Reduced	Preserved	Mismatch (viable hibernation)
Reduced	Reduced	Match (non-viable)
Preserved	Reduced	Reverse mismatch (altered regional glucose metabolism)

Figure 4 : Exemple d'interprétation, d'après Ghosh³², des résultats obtenus grâce au ^{18}F FDG-PET. La confrontation des données sur la perfusion tissulaire et le métabolisme cardiomyocytaire permet de différencier un tissu hibernant d'un tissu infarcté (ou cicatriciel/fibreux/nécrotique).

Le rapide aperçu de ces concepts, nous rappelle la difficulté de définir précisément le statut d'un myocarde souffrant d'ischémie chronique par insuffisance coronarienne. Il en découle naturellement la complexité de nos prises en charge thérapeutiques, bénéfiques pour les uns, inutiles pour les autres et pourtant souffrant tous d'une même cause. La médecine régénérative appliquée à la cardiopathie ischémique est donc un concept général répondant à une pathologie polymorphe. Par conséquent, répétons-le, pour chaque protocole de thérapie cellulaire et/ou d'ingénierie tissulaire il nous faut définir au mieux le statut myocardique ou ischémique que nous voulons traiter.

2. Infarctus aigu

L'infarctus du myocarde est la perte significative du contingent cardiomyocytaire suite à une ischémie ou à un défaut d'irrigation coronaire réversible ou non. Il survient habituellement après l'occlusion complète d'une branche vasculaire myocardique en l'absence d'une suppléance circulatoire efficace. Nous désignons sa survenue par l'adjectif "aigu", mais sa dénomination peut être enrichie par l'attribution de sa zone topographique de survenue plus ou moins étendue. Il est soit endocardique (si l'atteinte est restreinte) soit transmural (touchant l'ensemble de la paroi ventriculaire). L'ensemble des cascades biochimiques secondaires à l'ischémie³³ ne peut pas être détaillé ici, et nous ne nous limiterons qu'au rappel des principales conséquences macroscopiques, cellulaires et interstitielles qui concourent au socle conceptuel du bénéfice hypothétique de la thérapie cellulaire et/ou ingénierie tissulaire cardiaque.

En pratique, il existe une définition universelle de ce que l'on peut appeler "infarctus aigu"³⁴ post-ischémique, somme toute bien plus clinique que biologique. Celle-ci est régulièrement remise à jour en fonction des progrès des outils diagnostics disponibles pour la médecine. Dans tous les cas, elle désigne, par convention, l'ensemble du phénomène conduisant à la mort de cellules cardiomyocytaires (sous entendu "mort = disparition irréversible"). Aussi bien chez l'homme que chez le petit mammifère, on considère que la phase aiguë de l'infarctus est contemporaine d'une réaction inflammatoire locale et générale s'estompant significativement au delà de quelques semaines (en général cinq à six semaines chez l'homme et quatre semaines chez le rat). Divers points de vue concourent à la définition universelle de

l'IDM aigu, et permettent par conséquent de le mettre en évidence en temps réel et surtout *a posteriori* ; nous ne citerons ici que les plus spécifiques et les plus usuels.

-Le point de vue anatomo-pathologique permet la définition la plus indiscutable puisqu'elle est la seule qui confirme par l'observation directe la perte irréversible du contingent cardiomyocytaire contractile ainsi que la disparition d'un système microcirculatoire. En phase aiguë, de nombreuses cellules (polynucléaires neutrophiles en particulier) infiltrent le tissu ischémié. En outre, concernant la mort des cardiomyocytes, de plus en plus de données laissent suggérer que les phénomènes d'apoptose seraient prépondérants sur les phénomènes de nécrose cytotytique (oncoses).

-Le point de vue biochimique, grâce au dosage dans la circulation systémique de marqueurs plus ou moins spécifiques (par exemple myoglobine, troponine, CPK, LDH etc.), témoigne de la lyse cellulaire cardiomyocytaire. Indispensables dans le diagnostic d'infarctus aigu, ils deviennent néanmoins inutiles d'un point de vue qualitatif et quantitatif en phase chronique.

-Le point de vue de l'imagerie cardiaque sera évoqué ultérieurement, mais que ce soit les techniques de médecine nucléaire ou bien les méthodes échographiques, ce point de vue présente l'originalité de pouvoir quantifier, plus ou moins précisément, la nécrose myocardique aussi bien en phase aiguë qu'en phase chronique.

-Le point de vue de l'électrocardiographie ne peut être passé sous silence tant son apport quotidien est important et fondamental pour l'analyse des modifications électrophysiologiques post-ischémiques.

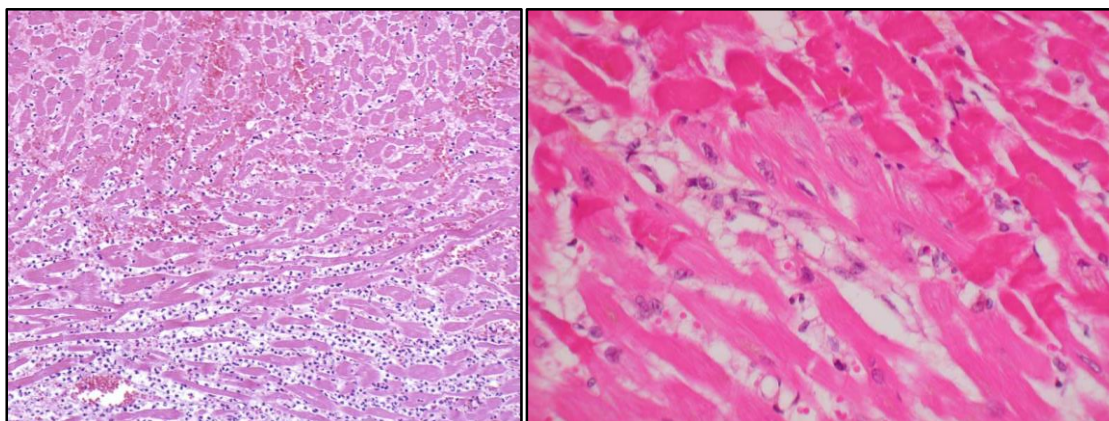


Figure 5 : Nécrose post-infarctus à la phase aiguë (nécrose de coagulation). Sur la photo de gauche on peut noter l'infiltration cellulaire, et à droite les cardiomyocytes avec un cytoplasme éosinophile et dépourvu de noyau désignent la zone nécrosée.

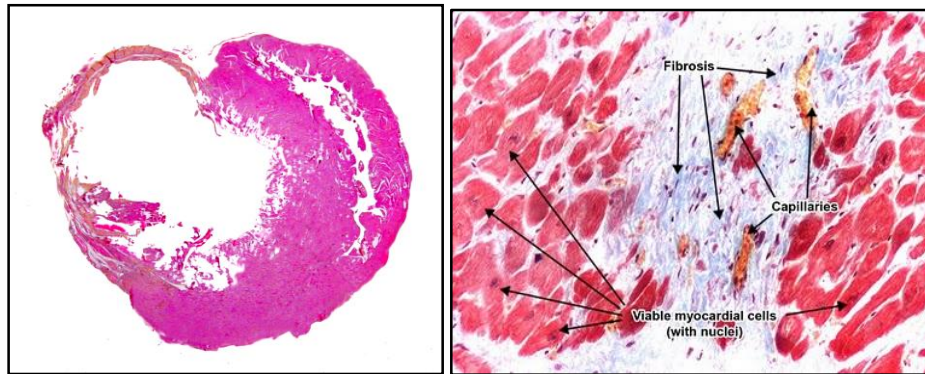


Figure 6 : Après quelques semaines, évolution vers la fibrose (phase chronique) et amincissement de la paroi ventriculaire.

3. Infarctus chronique et conséquences macroscopiques

Nous adopterons donc la définition classique de l'infarctus chronique comme l'ensemble des phénomènes modifiant la situation tissulaire cardiaque à la suite de l'infarctus aigu. Chez l'homme, comme nous l'avons dit, la période "infarctus aigu" se prolonge jusqu'à la 5ème ou 6ème semaine après l'apparition du phénomène. Chez le rat, la période "infarctus chronique" peut, elle, être désignée comme celle débutant dès la fin de la 4ème semaine après le début de l'infarctus aigu, phase à partir de laquelle l'inflammation aiguë post-nécrose cellulaire (se définissant par l'infiltration interstitielle de cellules exogènes) s'estompe significativement et la cicatrice fibreuse prend *grosso modo* sa taille définitive. La distinction entre phase aiguë et phase chronique de l'infarctus du myocarde correspond bien à une réalité mais reste tout de même quelque peu arbitraire puisque de nombreuses modifications tissulaires locales et globales se poursuivent bien au-delà de la 4ème semaine post-infarctus aigu suggérant ainsi un remodelage précoce, intermédiaire et tardif³⁵.

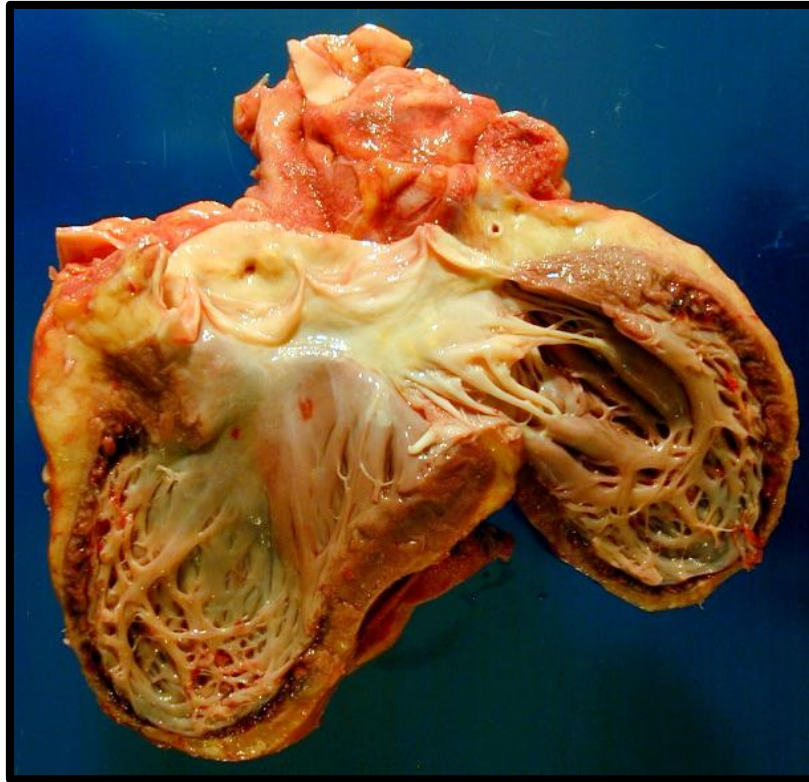


Figure 7 : Aspect macroscopique d'une séquelle d'infarctus. Cette photo montre explicitement l'amincissement de la paroi ventriculaire au niveau de l'apex.

Un certain nombre de modifications moléculaires, plus ou moins activées par l'hypoxie chronique (altération du métabolisme physiologique quasi-exclusivement aérobie) ou par l'augmentation de la pression ventriculaire endocavitaire (mécanismes de mécanotransduction) sont responsables d'une réorganisation cellulaire et interstitielle dont les conséquences peuvent se traduire *in fine* au niveau symptomatique clinique. Les modifications en taille, en forme ainsi que celles concernant l'altération de la fonction ventriculaire constituent le « remodelage ventriculaire ». Ces modifications ne concernent pas uniquement le tissu victime de l'infarctus à la phase aiguë. De nombreux travaux^{36, 37} ont déjà démontré que la zone d'infarctus tendait à s'étendre dans le temps. Cette expansion se fait au détriment d'une zone tissulaire acontractile mais complètement perfusée voisine de la zone cicatricielle fibreuse et qui progressivement va, elle aussi, subir aussi un remodelage (Il peut donc s'agir initialement de zone hibernante qui vont continuer à se dégrader). Nous voudrions ici insister sur la nature multifactorielle de la survenue du remodelage puisqu'il conjugue divers processus comprenant pêle-mêle l'activation

des axes neuro-hormonaux, la perte continue de cardiomyocytes fonctionnels par apoptose, l'effet chronique de la surcharge ventriculaire et la réorganisation de la matrice extra-cellulaire.

Après la survenue d'un infarctus du myocarde, le ventricule change donc de forme, de taille et finalement de fonction. Mais le remodelage ventriculaire n'est pas un phénomène linéaire unique: il peut être la conséquence de l'ensemble des cardiopathies. Dans le cas de la cardiopathie ischémique, la taille de l'infarctus et le délai depuis l'accident initial constituent des éléments essentiels qui conduiront à un remodelage corrélé à ces paramètres initiaux. Il s'agit néanmoins plus d'un phénomène évolutif que d'une conséquence terminale. Dans le cadre de notre expérimentation, quelques points peuvent être rappelés : le remodelage post-ischémique est un remodelage excentrique et asymétrique (à l'opposée du remodelage des cardiomyopathies dilatées dites "primitives") qui se caractérise par la dilatation de la cavité ventriculaire et l'amincissement de la paroi cardiaque ischémisée. Il implique aussi l'extension progressive de la zone infarctée à partir de la zone bordante essentiellement. L'anévrisme ventriculaire gauche en constitue une forme d'évolution caricaturale mais aussi particulièrement grave.

4. Conséquences cellulaires de l'infarctus

Le phénomène cellulaire post-infarctus caractéristique, d'ailleurs commun à de nombreuses cardiopathies dégénératives, est la mort cellulaire, c'est à dire la perte *a priori* irréversible d'un contingent plus ou moins important cardiomyocytaire contractile. L'estimation précise du nombre de cellules qui meurent reste à préciser bien que certains auteurs rapportent ce nombre entre 1 et 1,5 milliard de cellules chez l'homme pour ce qu'ils désignent comme un "infarctus typique". Le remodelage ventriculaire post-ischémique, désignant lui l'expansion de la zone infarctée, la dilatation ventriculaire ainsi que l'amincissement de la paroi ventriculaire³⁸, implique d'autres mécanismes de modification cardiomyocytaire dont les principaux semblent être l'hypertrophie cardiomyocytaire, l'élongation cytoplasmique et le réarrangement topographique de ces cellules.

Sans vouloir rentrer dans les détails des mécanismes de la mort cellulaire, nous tenons cependant à en rappeler les principes généraux, puisque leur connaissance inspire de nouvelles voies thérapeutiques souvent directement couplées aux thérapies cellulaires et/ou ingénieries tissulaires cardiaques³⁹. Le premier type de mort cellulaire à avoir été mis en évidence est celui désigné par le terme de "*nécrose cellulaire*"^{39, 40}. Brièvement, sa survenue peut se résumer comme suit: le métabolisme cardiomyocytaire physiologique est quasiment totalement aérobie (à environ 95%) mais suite à l'anoxie post-infarctus, la glycolyse anaérobie, prenant à son compte la production d'ATP, conduit à une accumulation de ion H^+ et donc acidifie le milieu cellulaire. Les pompes Na^+/H^+ s'activent, et à leur tour les échangeurs Na^+/Ca^{2+} réduisent leur capacité à déplacer le calcium intra-cellulaire dont la concentration cytoplasmique s'accroît. Le mouvement se poursuit par une augmentation du transport calcique vers les mitochondries, concomitante d'une augmentation de l'activité déshydrogénase dépendant du calcium et d'une réduction du flux d'électron au sein de la chaîne de transport mitochondriale (le ratio NADH/NAD diminue et la production de lactate augmente). Il en résulte une réduction de la concentration d'ATP et un accroissement des radicaux libres de l'oxygène. L'ensemble des pompes dépendantes de l'ATP dysfonctionnent, le milieu intra-cellulaire s'acidifie (accumulation H^+ , activation protéolytique au sein des lysosomes), la perméabilité membranaire mitochondriale s'accroît. *In fine*, le déséquilibre osmotique intra/extra-cellulaire conduit à une entrée massive d'eau intra-cellulaire entraînant un gonflement cellulaire et l'éclatement de la membrane plasmique. La nécrose cellulaire est aussi responsable de la réaction inflammatoire survenant en phase aiguë. En phase chronique, les mécanismes de la nécrose cellulaire adoptent d'autres voies mais semblent aussi contribuer à la progression des cardiopathies ischémiques vers un état d'insuffisance cardiaque.

L'*apoptose*, appelée aussi « mort programmée », est un autre type de mort cellulaire fortement impliquée dans l'évolution de la cardiopathie ischémique. Résumons-le rapidement; elle se caractérise par l'enchaînement d'une série de modifications morphotypiques comme la réduction de la taille cellulaire, la fragmentation membranaire et une rapide phagocytose par les cellules avoisinantes sans déclenchement de la réaction inflammatoire. La caractéristique biochimique de ce phénomène consiste en la fragmentation de l'ADN nucléaire. Ce phénomène d'apoptose a été mis en évidence aussi bien chez l'animal⁴¹⁻⁴³ que chez l'homme⁴⁴. De plus, ce phénomène est activé non seulement dans la zone touchée par l'infarctus aigu mais également à distance de la zone non perfusée³⁵ (*remote zone*). Cependant, à notre connaissance, il n'a pas

été démontré de corrélation importante entre l'intensité du remodelage ventriculaire telle la dilatation anévrysmale et le taux d'apoptose de la zone bordante, alors que cette corrélation devient plus évidente si on étudie les corrélations du remodelage ventriculaire global avec le taux d'apoptose dans les zones myocardiques à distance de la zone initialement infarctée³⁵.

Enfin, nous finirons en rappelant quelques points concernant le rôle de la *macro-autophagie*⁴⁵ survenant lors de l'infarctus. La macro-autophagie désigne le mécanisme d'englobement d'un grand volume du contenu cytoplasmique (dépôts de glycogène, ribosomes, organites tels les mitochondries et les péroxysomes) dans une vacuole autophagique. Cette dernière fusionne avec des lysosomes pour former un autolysosome. Le produit non dégradé de cette digestion intra-cellulaire constitue le *corps résiduel*. Bien que les mécanismes exacts soient toujours en cours d'investigation, nous savons que chez les eucaryotes⁴⁵ et en particulier dans les cardiomyocytes⁴⁶, la privation de nutriments, l'hypoxie et les radicaux libres de l'oxygène, induisent ce mécanisme d'autophagie. Dans le cas de l'infarctus du myocarde, nous ne possédons que peu d'informations³⁹ mais certaines observations suggèrent que ce mécanisme pourrait jouer un rôle particulier dans les zones bordantes de la cicatrice fibreuse et contribuer ainsi au remodelage chronique. Par exemple, l'équipe de Buss a montré chez le rat, que l'inhibition mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) pouvait limiter le remodelage post-infarctus suggérant l'augmentation du mécanisme autophagique par cette voie au niveau des cardiomyocytes de la zone bordante, entraînant à son tour une limitation de l'activité protéolytique⁴⁷.

Nous avons évidemment focalisé ces rappels sur le *cardiomyocyte ventriculaire* qui n'est bien entendu pas la seule cellule victime du processus ischémique. Ce groupe est lui-même constitué de différents contingents plus ou moins exposés: les *cellules-M*, les *cardiomyocytes sous-endocardiques* et les *cardiomyocytes sous-épicaux*. Par ailleurs, le fonctionnement cardiaque dépend étroitement du *contingent cellulaire non-cardiomyocytaire* constitué par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules sympathiques et para-sympathiques, les cellules du squelette cardiaque, les cellules immunitaires et bien entendu les *cellules pace-makers* qui peuvent aussi être classées dans le groupe des cardiomyocytes.

5. Conséquences interstitielles de l'infarctus

Le tissu infarci est essentiellement occupé par des fibroblastes qui sont les concepteurs de la cicatrice fibreuse. L'espace interstitiel du myocarde est occupé par des fibres de collagène de type I et III qui s'organisent en un réseau qui maintient l'architecture myocardique et l'alignement des cardiomyocytes tout au long du cycle cardiaque (représentant environ 80% et 10% de la quantité de collagène respectivement). L'organisation spiroïdale des fibres facilite la transmission de la force générée par la contraction cellulaire vers la cavité ventriculaire durant la systole, et permet le stockage énergétique (et sa restitution) à l'origine du relâchement rapide des fibres myocytaires, lui-même à l'origine de la phase de remplissage rapide de ventricule. Ce maillage participe aussi à la solidité tissulaire permettant la prévention de la rupture musculaire, aussi bien à l'état physiologique, qu'à la suite d'un infarctus du myocarde. La rupture ventriculaire reste en effet, bien heureusement, une complication très rare de l'infarctus aigu mais de pronostic extrêmement sévère.

En situation d'ischémie chronique ou bien à distance de la survenue d'un ou plusieurs épisodes d'infarctus aigu, la cicatrice fibreuse constitue en quelque sorte la signature de la mort cardiomyocytaire, puisque les cardiomyocytes sont remplacés par des fibres de collagène I (augmentation du ratio collagène I/collagène III). En plus de cet aspect visible macroscopiquement, la fibrose s'étend tout autour des structures vasculaires et microvasculaires voisines en réduisant par la même occasion les espaces interstitiels, entraînant alors, une réduction de la taille des cardiomyocytes situés au voisinage de la zone infarctée proprement dite (phénomène d'atrophie). Les observations post-mortem de patients ayant présenté des infarctus du myocarde confirment ce phénomène d'extension fibreuse qui s'étend bien au-delà de la zone privée de circulation de façon chronique. Ce phénomène évolutif s'explique en partie par l'occupation de la zone lésée par des cellules proches des *fibroblastes*, appelées plus précisément *myofibroblastes* car elles expriment l' α -actine musculaire lisse. Ces cellules possèdent jusqu'à un certain degré des propriétés contractiles très limitées et orientent essentiellement leur métabolisme dans la formation du collagène de type I. Notons ici que ce sont ces cellules qui expriment en partie l'angiotensinogène et la rénine intracellulaire à l'origine de l'expression extracellulaire de l'angiotensine II, cibles essentielles de notre pharmacopée lusitrope. Les *métalloprotéinases* (MMPs), qui sont activées lors de la première semaine suivant l'infarctus aigu, ne contribue que partiellement dans l'extension fibreuse observée en cas de

cardiopathie ischémique chronique. Notons que son origine n'est probablement pas unique et qu'une voie de différenciation a été mise en évidence, entre autres, à partir de la cellule souche mésenchymateuse d'origine médullaire.

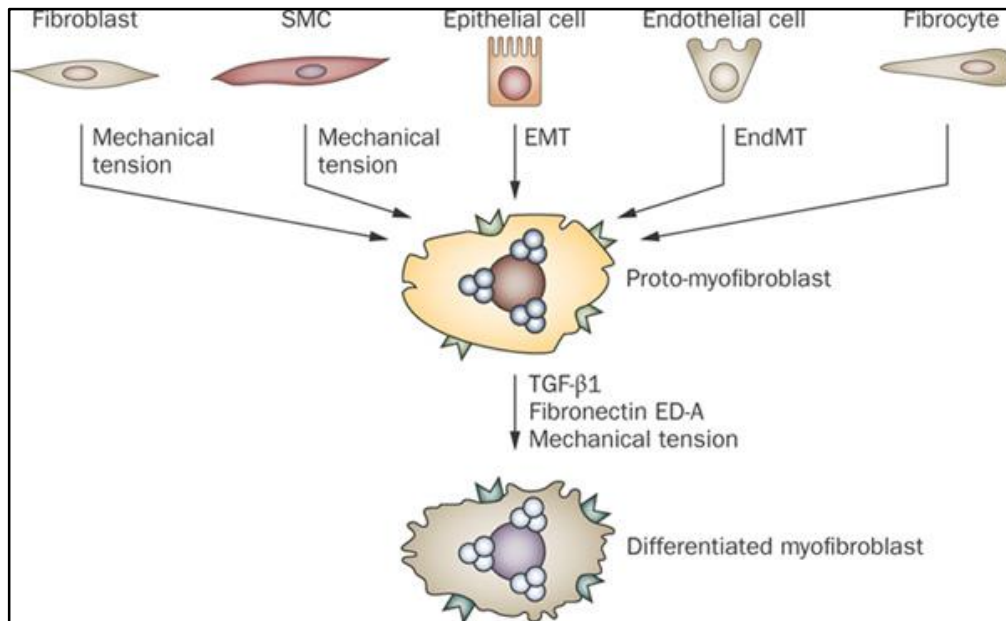


Figure 8 : Origines diverses possibles des myofibroblastes retrouvés dans le myocarde infarcté remodelé d'après Van Den Borne et al⁴⁸.

6. Vascularisation : impact macro et micro circulatoire de l'infarctus du myocarde.

Le système circulatoire cardiaque constitue une pièce maîtresse dans le fonctionnement myocardique. Dans le cœur sain, l'essentiel de la résistance artérielle se situe au niveau artériolaire⁴⁹ (vaisseaux de 50 à 150 μm de diamètre, c'est-à-dire microcirculatoire). Le tonus artériolaire dépend de la demande métabolique tissulaire et peut augmenter le débit coronaire jusqu'à cinq fois sa valeur basale en réponse à divers stimuli, comme l'adénosine ou une brève période d'ischémie. Par contre, en cas d'insuffisance coronarienne d'origine athéromateuse, l'élément résistif limitant se redistribue au niveau des artères et artéριοles de plus gros diamètre. Nous connaissons assez bien la répartition macroscopique coronaire et c'est cette cible que nous

pouvons le mieux atteindre par nos thérapeutiques dites « de *revascularisation myocardique* » endoluminales ou chirurgicales. De plus, pendant une période plus ou moins longue, la perfusion myocardique est maintenue grâce à des mécanismes d'autorégulation. Peu à peu, ces mécanismes finissent par être dépassés et le tissu souffre d'ischémie jusqu'au stade ultime par privation macro-circulatoire secondaire à l'infarctus par thrombose coronaire.

La répartition microcirculatoire et surtout son fonctionnement par rapport au tissu contractile qui l'entoure est plus difficile à analyser (mesures par vidéomicroscopie ou myographe par exemple) et reste encore à préciser. Néanmoins, le concept de *résistance coronaire microcirculatoire* (CMVR ou coronary microvascular resistance) semble plus clair depuis quelques années⁵⁰. Il n'est pas question ici de détailler ce sujet mais simplement d'en rappeler deux éléments primordiaux ; premièrement, *la régulation du tonus artériolaire* est extrêmement complexe et sous l'influence de diverses voies moléculaires. D'ailleurs, leurs rôles évoluent avec la cardiopathie ischémique comme par exemple le rôle du complexe rénine-angiotensine⁵¹, le rôle de la fonction endothéliale⁵² ou encore celui des canaux calciques et potassiques impliqués dans la contraction/relaxation des fibres musculaires⁵³. Deuxièmement, la CMVR n'est pas seulement déterminée par les caractéristiques intrinsèques des micro-vaisseaux mais aussi par *la fonction cardiaque globale et la nature interstitielle péri-vasculaire* qui, en augmentant les contraintes extrinsèques, modifient et régulent également le flux coronaire tissulaire^{54, 55}.

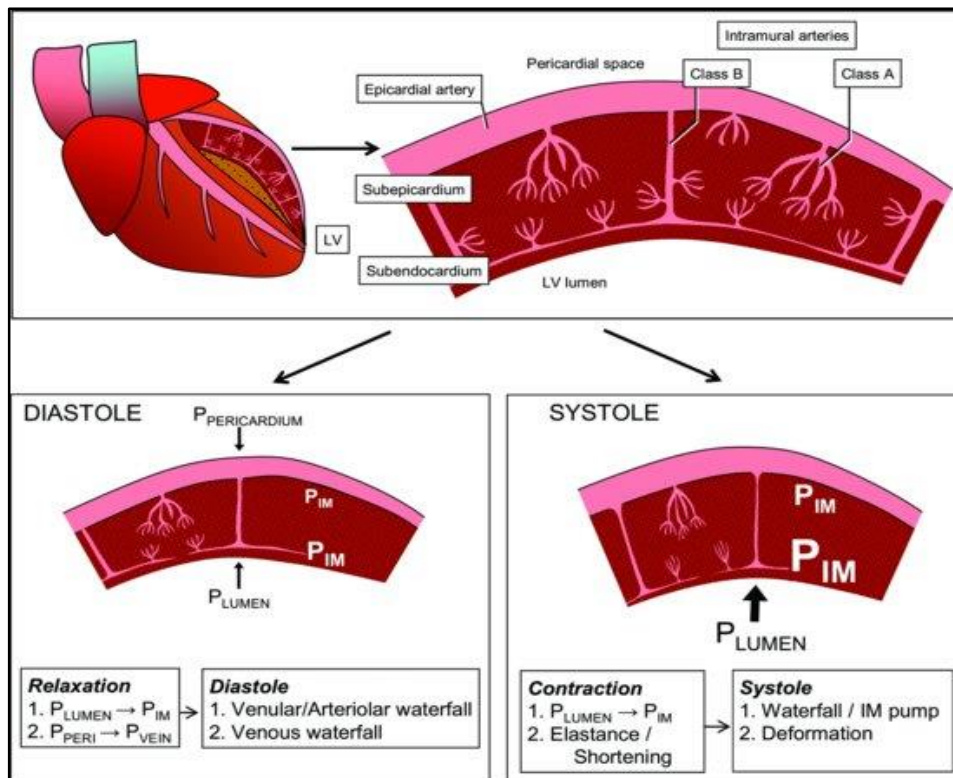


Figure 9 : représentation schématique du rôle des pressions tissulaires sur la microcirculation.

En cas d'infarctus chronique, les examens nucléaires cardiaques de routine permettent de quantifier la réduction de la perfusion tissulaire. Cette mesure est corrélée à l'altération micro-circulatoire de la zone infarctée qui elle-même est un élément pronostic de la survie cardiomyocytaire (signalons rapidement que l'ischémie/reperfusion peut aussi occasionner des lésions durables équivalentes à celles secondaires à l'infarctus). Aussi, nous concevons facilement que le rétablissement du mécanisme micro-circulatoire soit devenu une des cibles prioritaires des thérapies cellulaires cardiaques ainsi qu'un des défis lancés à l'ingénierie tissulaire cardiaque qui non seulement doit trouver une solution de reconstruction cardiomyocytaire mais aussi une solution pour recréer le lien vasculaire entre le tissu hôte et le tissu greffé.

7. Impact de la cardiopathie ischémique sur la fonction ventriculaire.

Nous avons largement insisté sur l'hétérogénéité des situations d'ischémie myocardique et nous pourrions en déduire logiquement une hétérogénéité de l'atteinte fonctionnelle. Initialement diastolique puis systolique, l'atteinte ventriculaire revêt une importance essentielle puisqu'elle engendre directement une symptomatologie bien connue chez le malade. De plus, nous savons qu'elle est fortement corrélée à la mortalité post-ischémique⁵⁶ (Heart and Stroke Statistical update. The American Heart Association, Dallas, 1999).

L'atteinte de la fonction ventriculaire peut être régionale ou globale. Dans tous les cas, l'atteinte de la fonction systolique traduit un défaut de contractilité mais rappelons encore que ce dysfonctionnement peut toucher des territoires viables (myocarde sidéré et myocarde hibernant) ou non viables (infarctus chronique appelé aussi nécrose myocardique). D'emblée nous pouvons donc déduire une série de mécanismes physiopathologiques à l'origine de la perte de la contraction, le plus évident et le plus grave étant la perte définitive du matériel contractile autrement dit des cardiomyocytes comme c'est le cas dans l'infarctus chronique. L'hypertrophie cardiomyocytaire compensatrice et l'effet Starling liée à l'étirement des fibres ne suffisent pas, à cause de la progression du remodelage, à compenser cette perte et donc à maintenir une fonction adaptée à la demande. L'étude de la viabilité, essentielle dans le pronostic du succès d'une revascularisation coronarienne, doit donc s'intégrer impérativement à l'étude de la fonction ventriculaire. Le choix des méthodes d'investigations fonctionnelles (cathétérisme cardiaque, médecine nucléaire, IRM cardiaque, échographie de stress...) et leur interprétation restent néanmoins complexes y compris quant à leur réelle valeur pronostic. En effet, des analyses histologiques myocardiques révèlent des situations souvent hétérogènes y compris régionalement au sein d'un même ventricule, montrant parfois des zones tissulaires à la fois partiellement infarctées et partiellement hibernantes.

La fonction "pompe", comme la fonction "perfusion" d'ailleurs, fait l'objet de modélisations mathématiques complexes qui présentent l'intérêt d'intégrer enfin les propriétés physico-chimiques du tissu myocardique comme sa compliance globale ou encore la viscoélasticité des couches myocardiques, en plus des propriétés de contraction sarcomérique régionale ou globale. Du niveau cellulaire au niveau cardiaque macroscopique, la fonction

semble complètement liée à la structure de l'architecture ventriculaire. Cliniquement, la traduction en est l'altération de la fonction ventriculaire qui finit par accompagner le processus de remodelage ventriculaire. Ces concepts généraux, que nous développerons mieux après la présentation de nos expériences, sont fondamentaux pour comprendre l'approche globale que constitue pour nous la thérapie cellulaire et/ou l'ingénierie tissulaire : plus qu'une substitution cellulaire ou tissulaire, l'ambition réelle de ces techniques vise essentiellement la restauration d'une fonction. En thérapie cellulaire et/ou ingénierie tissulaire cardiaque, la fonction "pompe" du ventricule est la fin qui justifie les moyens.

II. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DE MOELLE OSSEUSE

1. Définition et réservoir

La définition de ce que constitue une cellule souche mésenchymateuse de moelle osseuse (CSM) s'affine avec l'amélioration de la caractérisation de ce type cellulaire, bien qu'elle tienne sa définition initiale, qui reste valable, des conditions de sélection de celle-ci. Alexander Friedenstein, du Gamaleya Institute de Moscou, a réussi à isoler des cellules issues de la mise en culture de moelle osseuse qui présentaient la capacité de s'accrocher à la paroi des boîtes de culture cellulaire et qui étaient capables de se différencier en cellules ostéoprogénitrices⁵⁷. Par la suite, différentes recherches concernant la concentration et la composition idéale du sérum bovin fœtal (FBS, *Fetal Bovin Serum*) ont permis le développement de cultures de cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse de manière mieux systématisée. Peu à peu, divers auteurs démontrèrent qu'à partir d'un même contingent cellulaire, il était possible d'obtenir des lignées osseuses, cartilagineuses, des adipocytes et mêmes des myocytes : les cellules souches mésenchymateuses étaient donc capables d'évoluer en divers types cellulaires au phénotype bien caractérisé faisant d'elles des *cellules souches adultes dites multipotentes*. De nos jours, les CSMs peuvent être cultivées in vitro soit à partir de technique de culture par méthode d'adhérence soit par sélection de gradient de densité. Néanmoins, il n'existe pas de méthode permettant pour l'instant de prédire l'évolution de la CSM ou de façon plus pragmatique, nous ne connaissons pas l'ensemble des marqueurs de surface exacts qui caractérisent les CSMs. Même s'il ne s'agit pas directement de l'objet de notre investigation, rappelons l'essentiel de la carte d'identité membranaires des CSMs :

-Marqueurs positifs pour les CSMs⁵⁸ : CD13, CD29, **CD44**, CD49b Integrin $\alpha 2$, CD49e Integrin $\alpha 5$, CD54 ICAM1, CD71 Transferrin Rec, CD73 SH-3, **CD90** Thy-1, CD105 Endoglin, SH-2, CD106 VCAM, CD166 ALCAM.

-Autres marqueurs moins positifs des CSMs: B2-Microglobulin, Nestin, p75, HLA ABC, SSEA-4, TRK (ABC)

-Marqueurs négatifs pour les CSMs : CD11, CD14, CD18 Integrin β 2, CD31 PECAM, **CD34**, **CD45**, CD49d Integrin α 4, CD50 ICAM 3, CD62E E-Selectin, CD117, CD133.

-HLA DR est negative mais inductible avec de l'interféron- γ .

Nous avons inscrit en caractère gras CD34, CD44, CD45, CD90 qui caractérisent souvent communément les CSMs et l'étude de ces marqueurs est d'ailleurs le choix que nous avons fait au cours de notre expérience.

Les cellules souches mésenchymateuses ne se trouvent pas exclusivement au sein de la moelle osseuse ; elles sont aussi présentes au sein de la plupart des tissus conjonctifs du corps humain mais en quantité plus restreinte (par exemple dans le tissu adipeux ou encore dans la pulpe dentaire). Dans la moelle, leur nombre est bien moindre que celui des cellules souches hématopoïétiques. On estime ainsi qu'elles ne représenteraient que 1 sur 10000 à 1 sur 100000 cellules présentes dans la moelle osseuse, avec un nombre absolu qui décroît avec l'âge⁵⁹.

Par contre, une fois mises en culture dans les conditions adéquates que nous décrirons plus tard, elles présentent un fort pouvoir mitotique si bien qu'une seule de ces cellules peut être à l'origine de près d'1 million en à peine trois semaines. Elles conservent cependant une propriété d'inhibition de contact (« *contact inhibited* »). Ceci signifie que lorsque leur confluence devient conséquente, les cellules ralentissent leur vitesse de division jusqu'à l'arrêt complet de cette division. Ce phénomène pourrait expliquer en partie leur nombre restreint *in vivo*. Cette propriété concernant leur limitation de multiplication est par ailleurs très intéressante dans l'optique d'une utilisation clinique puisque qu'elle diminuerait, a priori, le risque tumoral en cas de transplantation dans le tissu cardiaque *in vivo*.

2. Plasticité et potentiel cardio-vasculaire

Il a été possible de différencier les CSMs en différentes lignées : ostéocytes, arthrocytes, adipocytes, cellules musculaires mais aussi en cellules non issues du mésenchyme : cellules neurales, cellules épidermiques. Sa capacité de se différencier en cellule musculaire et *a fortiori* en cardiomyocyte réellement "mature et fonctionnel" reste tout de même encore très controversée.

In vitro, Fukuda et Makino dès 1999⁶⁰ ont rapporté *la possibilité de transdifférencier des CSMs en cardiomyocytes après les avoir traitées avec de la 5-azacytidine*. Quelques temps plus tard, la même équipe démontre que ces cellules cardiogéniques peuvent être greffées dans le myocarde de souris et peuvent s'intégrer et adopter les caractéristiques des cellules du tissu hôte⁶¹. Néanmoins, du même aveu de l'équipe pionnière en la matière⁶², deux écueils principaux persistent dans cette approche: (1) la 5-azacytidine est un agent déméthylant potentiellement tératogène, (2) l'efficacité en terme d'obtention de lignée cardiogénique à partir des cellules de moelle osseuse mises en culture reste modérée. Différents travaux ont pourtant confirmé cette potentialité en obtenant des cellules exprimant des marqueurs cardiomyocytaires (par exemple la myosine, l' α -actinine, la vimentine ou la troponine I) à partir de CSMs d'origine médullaire⁶³,⁶⁴ mais aussi à partir de celles issues de la graisse sous-cutanée⁶⁵ et du cordon ombilical⁶⁶. Les travaux sur le rôle de l'épigénétique⁶⁷ et donc des facteurs de méthylation de l'ADN dans le devenir cellulaire phénotypique suggère que les CSMs capables de se différencier en cardiomyocytes pourraient être des cellules souches cardiogéniques encore indifférenciées, bien que beaucoup d'autres groupes cellulaires aient aussi montré la possibilité de se différencier en cellules présentant aussi des caractéristiques cardiomyocytaires^{68, 69}.

La co-culture entre CSMs et cardiomyocytes in vitro constitue une autre source d'obtention de cellules aux caractéristiques cardiomyocytaires à partir des CSM. L'équipe de Wang⁷⁰, a induit une différenciation des CSMs en une lignée exprimant l' α -actinine, la desmine, la cTnT, toutes caractéristiques du versant cardiomyocytaire mais aussi une lignée exprimant plutôt des marqueurs de cellules musculaires lisses (calponin, α -SMA) à partir d'une co-culture de CSMs et de cardiomyocytes adultes chez le rat. Les conditions de culture, co-culture, facteurs de croissances, etc., des CSMs sont donc déterminantes : en présence de VEGF, IGF-1 et EGF par exemple, la différenciation endothéliale paraît bien documentée aujourd'hui⁷¹. Une autre étude a montré, elle, la possibilité d'obtenir des cardiomyocytes-like à partir de CSMs humaines traitées avec un cocktail contenant de l'insuline, de la dexaméthasone et de l'acide ascorbique⁷². Le potentiel du devenir phénotypique ne suffit pas à garantir un résultat thérapeutique. Nous évoquerons les problématiques de l'intégration cellulaire et les principaux résultats obtenus dans ces tentatives lors des prochains chapitres.

Electrostimulation :

Les cellules souches ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires qui font d'elles une possibilité attractive pour la régénération des tissus myocardiques. La différenciation des cellules souches peut être achevée par une stimulation physique externe comme l'électrostimulation (a, b, c), par champs magnétiques (d) et par compression cyclique (e). L'électrostimulation est une méthode sûre pour induire des modifications physiques et biochimiques des cellules souches vers des cellules cardiaques, sans utiliser des vecteurs viraux ou d'agents « déméthylants ». L'azacitidine et un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, d'où son nom d'agent déméthylant (f). L'électrostimulation des cellules souches implantées dans une matrice de collagène pourrait être une approche sûre et efficace pour la survie et la différenciation de cellules souches en cellules cardiaques. Cette matrice biologique pré-conditionnée pourrait être utile pour le support et la régénération du myocarde chez les patients ayant une cardiomyopathie ischémique (g).

REF. :

- a. Genovese JA, Spadaccio C, Chachques E, Schussler O, Carpentier A, Chachques JC, *et al.* Cardiac pre differentiation of human mesenchymal stem cells by electrostimulation. *Front Biosci* 2009; 14: 2996-3002.
- b. Flaibani M, Boldrin L, Cimetta E, Piccoli M, De Coppi P, Elvassore N. Muscle differentiation and myotubes alignment is influenced by micropatterned surfaces and exogenous electrical stimulation. *Tissue Eng Part A*, 2009; 15:2447-57.
- c. Shafy A, Lavergne T, Latremouille C, Cortes-Morichetti M, Carpentier A, Chachques JC. Association of electrostimulation with cell transplantation in ischemic heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138: 994-1001.
- d. Yan J, Dong L, Zhang B, and Qi N. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagn Biol Med* 2010; 29: 165-176.
- e. Michalopoulos E, Knight RL, Korossis S, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Development of methods for studying the differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic compressive strain. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011 Dec 13.
- f. Ling SK, Wang R, Dai ZQ, Nie JL, Wang HH, Tan YJ, *et al.* Pretreatment of rat bone marrow mesenchymal stem cells with a combination of hypergravity and 5-azacytidine enhances therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Biotechnol Prog* 2011, 27: 473-482.
- g. Haneef K, Lila N, Benadda S, Legrand F, Carpentier A, Chachques JC. Development of bioartificial myocardium by electrostimulation of 3D collagen scaffolds seeded with stem cells. *Heart International* 2012; 7:e14.

3. CSMs et facteurs paracrines

Depuis quelques années, nous savons le rôle essentiel que joue le microenvironnement sur la biologie cellulaire. En ce sens, le rôle des CSMs dans le tissu sain et dans le tissu lésé

tient une place particulière. Les CSMs semblent réguler leur microenvironnement non seulement par contact direct mais surtout via une activité paracrine intense. Différents mécanismes peuvent alors être induits comme l'angiogénèse, l'action anti-apoptose, l'action mitogène et aussi la libération de facteur de homing. Parmi les principaux facteurs de croissance et cytokines, retenons : VEGF, HGF, IGF-1 et SDF-1. L'induction d'une "hyper-expression" d'un facteur déterminé constitue en soi une nouvelle cible thérapeutique déjà en cours d'évaluation⁷³.

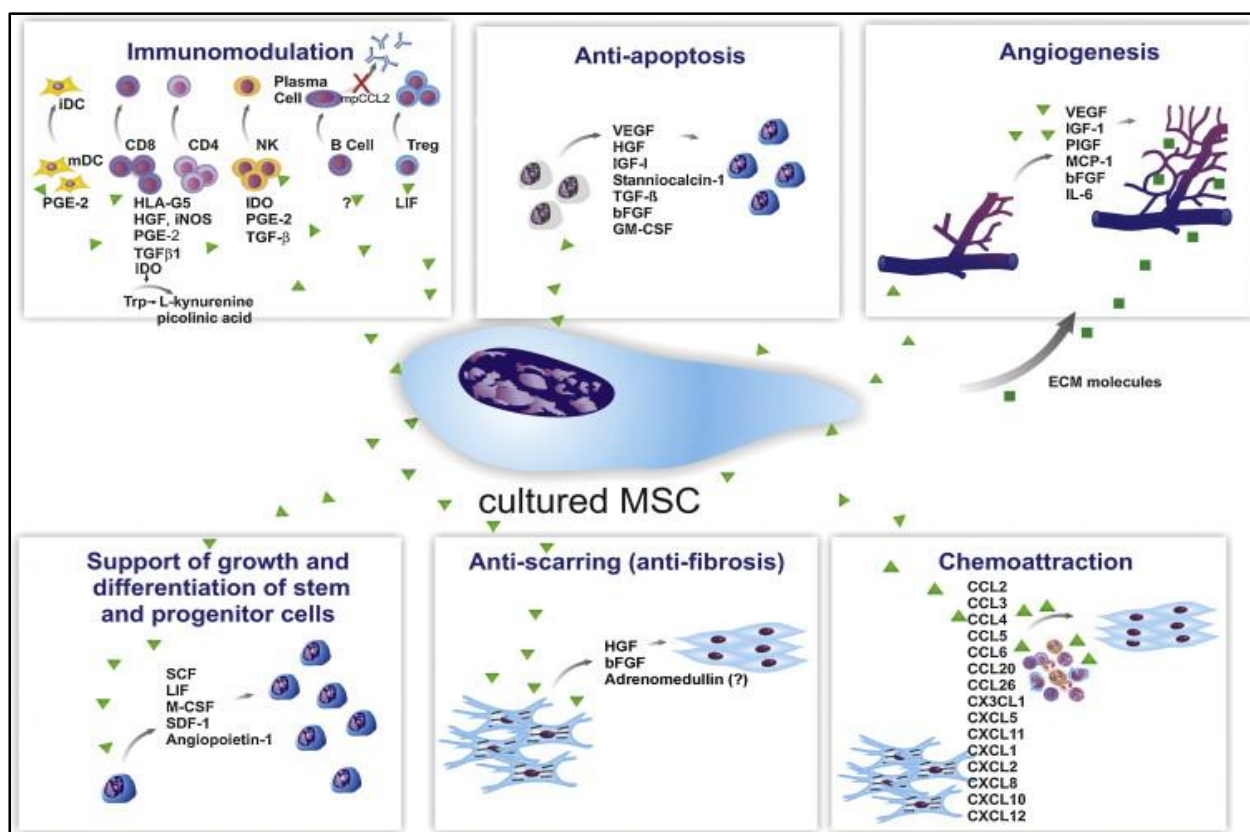


Figure 10 : Mécanismes impliqués dans les propriétés thérapeutiques des CSMs et rôle des facteurs paracrines. D'après L.da Silva Meirelles et al⁷⁴.

De plus, l'activité paracrine des CSMs a pu être utilisée dans le but d'induire l'activité des cellules progénitrices cardiaques (cellules CPC) résidentes dans le myocarde⁷⁵. Tant leur migration que leur survie sont favorisées par HGF, VEGF et IGF-1. Les CSM pourraient aussi

favoriser le homing des cellules progénitrices endothéliales (cellules EPC) par l'intermédiaire de la sécrétion de SDF-1 α ⁷⁶.

4. Immunogénécité et immunomodulation des CSMs

Les CSMs auraient une activité immunomodulatrice par des effets immunosuppresseurs. Bien que les CSMs expriment le MHC de classe I, elles ne possèdent pas le composant B7, molécule co-stimulatrice, et peuvent donc échappées à la reconnaissance des CD4⁺T helpers et CD8⁺ cytotoxiques. Les CSMs semblent aussi interagir avec d'autres cellules immunitaires comme les T helper 1 et 2, les cellules dendritiques en réduisant leur production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron γ (IFN- γ) et diminuent l'activité des cellules NK (Natural Killer) par l'intermédiaire d'une réduction de la production d'IL-2. Les CSMs, grâce à leur immunogénécité réduite, peuvent donc aussi être utilisées pour traiter des organismes allogéniques.

5. Résistance à l'hypoxie et à la privation de glucose

Certains travaux⁷⁷ ont avancé des preuves de la supériorité des MSC sur les cardiomyocytes quant à leur résistance à l'hypoxie suggérant que ces cellules font preuve d'une plus grande flexibilité métabolique pour reprendre l'expression de certains auteurs⁷⁷. L'hypoxie semble être un inducteur de la réaction apoptotique chez la MSC⁷⁸ mais cette induction ne prendrait effet que beaucoup plus tardivement que pour le cardiomyocyte natif. Ce mécanisme adaptatif est dépendant de la glycolyse. De plus, l'hypoxie ne bloque pas les potentiels de transdifférenciation cellulaire. Après 48 heures d'hypoxie, seules 15% des MSCs dans l'étude de Mylotte⁷⁷ présentaient des signes de mort cellulaire, grâce au maintien d'un métabolisme anaérobie reposant sur des concentrations faibles en ATP basé sur un métabolisme glycolysique.

Le préconditionnement à l'hypoxie avant transplantation dans un IDM est devenu dès lors une nouvelle voie d'optimisation des propriétés bénéfiques des CSMs. L'hypoxie induirait une production accrue de facteurs utiles à la survie et à l'angiogénèse⁷⁹ comme Hif-1, Ang-1, VEGF, Flk-1, érythropoïétine (EPO), Bcl-2. Encore plus surprenant, les CSMs préconditionnées dans un milieu anoxique développeraient aussi des propriétés cardioprotectrices⁸⁰.

Dans le cadre de notre travail, ces observations assez récentes que nous ne pouvons pas détaillées ici, sont venues soutenir la validité de l'hypothèse de la survie des CSMs *in vivo* dans un milieu hypoxique comme celui de la nécrose myocardique.

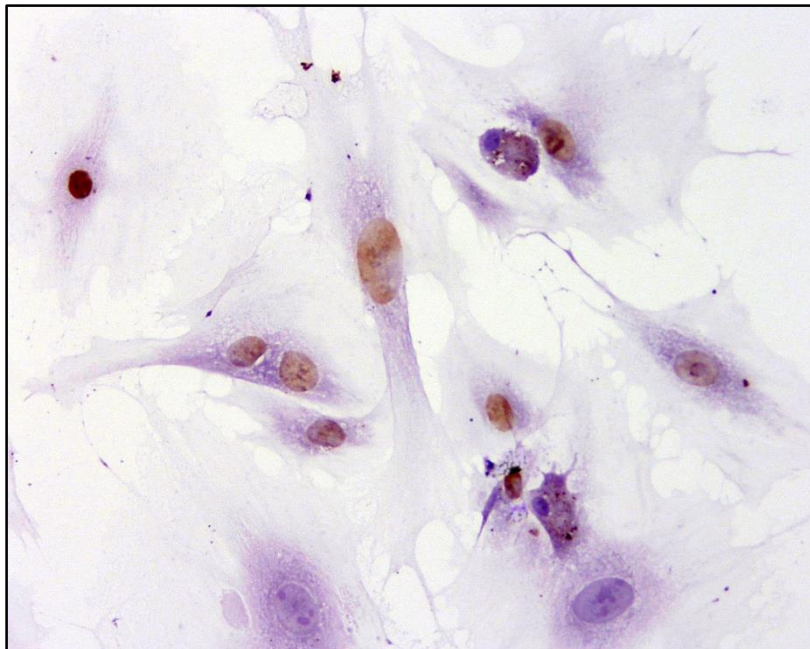


Figure 11: Aspect morphologique "fibroblast-like" de CSMs en culture. (Photo prise dans notre Laboratoire).

III. LE CONCEPT DE LESION/REPARATION AU NIVEAU MYOCARDIQUE

Chez l'homme, comme chez la majorité des mammifères, la régénération cardiomyocytaire semble être un phénomène marginal⁸¹. Aussi, l'incapacité apparente de notre cœur de tout pouvoir "auto-réparateur" nous a conforté depuis de nombreuses années dans les stratégies thérapeutiques à suivre. Dans ce domaine, la transplantation cardiaque apparaît comme le plus radical mais aussi le plus efficace des traitements de l'insuffisance cardiaque terminale dont, rappelons-le, presque la moitié des cas sont secondaires à une cardiopathie ischémique évolutive. Néanmoins, les difficultés organisationnelles d'une part (diagnostic de la mort cérébrale, pénurie d'organes) et thérapeutiques d'autre part (problème du rejet et effets secondaires liés à l'immunosuppression) limitent largement la diffusion de cette prise en charge qui demeure encore l'exception comparativement à l'étendue de la pathologie⁸² (En France, par exemple, nous réalisons moins de 400 transplantations cardiaques par an).

La nécessité de découvrir d'autres options thérapeutiques pouvant rétablir une fonction cardiaque est donc toujours restée un challenge dans le domaine de la cardiologie. La thérapie cellulaire, déjà appliquée dans d'autres disciplines, ne semblait pas convenir au myocarde avant l'émergence de l'utilisation des cellules souches puisqu'il paraissait peu concevable d'obtenir, à partir de biopsies par exemples, suffisamment de cardiomyocytes natifs pour compenser la pénurie myocytaire de l'organe malade... Mais la découverte du potentiel inhérent à la plasticité de certaines cellules souches a permis d'entretenir cette perspective et la mise en évidence que certaines cellules souches extra-cardiaques, pour l'essentiel d'origine médullaire, présentaient la capacité de se greffer au sein du myocarde lésé, a fini par convaincre de la possibilité d'éventuels bénéfices. Les premières observations^{83, 84} ayant démontré la capacité migratrice de cellules vers le myocarde sont issues de l'étude de biopsies endomyocardiques réalisées chez des patients masculins ayant été transplantés avec un cœur de femme. Chez ces patients, les biopsies ont montré clairement des cellules à phénotype cardiomyocytaire avec des noyaux dont le matériel chromosomique confirmait l'origine masculine. Bien que l'origine précise de ces cellules reste débattue, deux concepts ont pu émerger: *premièrement, le myocarde lésé attire des cellules souches par un mécanisme qui devait se préciser par des travaux ultérieurs et deuxièmement, ces cellules souches particulières ont la capacité de se greffer au sein du tissu lésé*. De plus, depuis ces premières études, d'autres observations suggèrent fortement que ces

cellules souches peuvent se différencier en cardiomyocytes capables de s'intégrer au reste du contingent cellulaire local.

Dès lors, quelques unes des hypothèses sous-jacentes expliquant l'efficacité de la médecine régénératrice par thérapie cellulaire et/ou ingénierie tissulaire peuvent s'appuyer sur des phénomènes physiologiques et physiopathologiques "naturels". Certains de ces aspects sont évoqués dans ce chapitre que nous élargirons à certains concepts de la réparation chirurgicale avant de rappeler quelques uns des principaux résultats d'une application thérapeutique qui a maintenant déjà plus d'une décennie.

1. Embryogénèse cardiaque: le modèle originel.

Tous les tissus de l'embryon sont issus des cellules de la masse interne (inner cell mass) du blastocyste précoce⁸⁵. Ces cellules sont initialement *totipotentes*, ce qui signifie que ces cellules peuvent se différencier dans toutes les cellules du corps humain si elles se trouvent dans la situation adéquate. *Au fur et à mesure du développement, le potentiel de différenciation cellulaire s'amointrit* jusqu'à la constitution d'un tissu dit différencié des différents organes qui nous constituent. Les tissus à renouvellement « rapide » comme le sang ou la peau sont connus depuis longtemps pour présenter des cellules souches, présentant des caractéristiques communes avec les cellules embryonnaires indifférenciées capables de se renouveler dans leur état indifférencié et de se différencier. En fait, depuis la multiplication des études à propos des cellules souches, il s'avère qu'elles seraient bien plus répandues qu'initialement pensé, et ce dans l'ensemble des organes. Ces observations sont venues alimenter l'espoir d'une médecine régénérative par amplification des possibilités de renouvellement préexistantes. C'est pourquoi, il nous semble essentiel d'investiguer le domaine du développement embryologique puisque la formation du muscle cardiaque peut servir de trame ou quelque part de modèle naturel dans la perspective de la thérapie cellulaire cardiaque. Ce bref rappel permet lui-aussi de préciser le cadre conceptuel de notre travail expérimental et nous aidera à enrichir notre réflexion ultérieure.

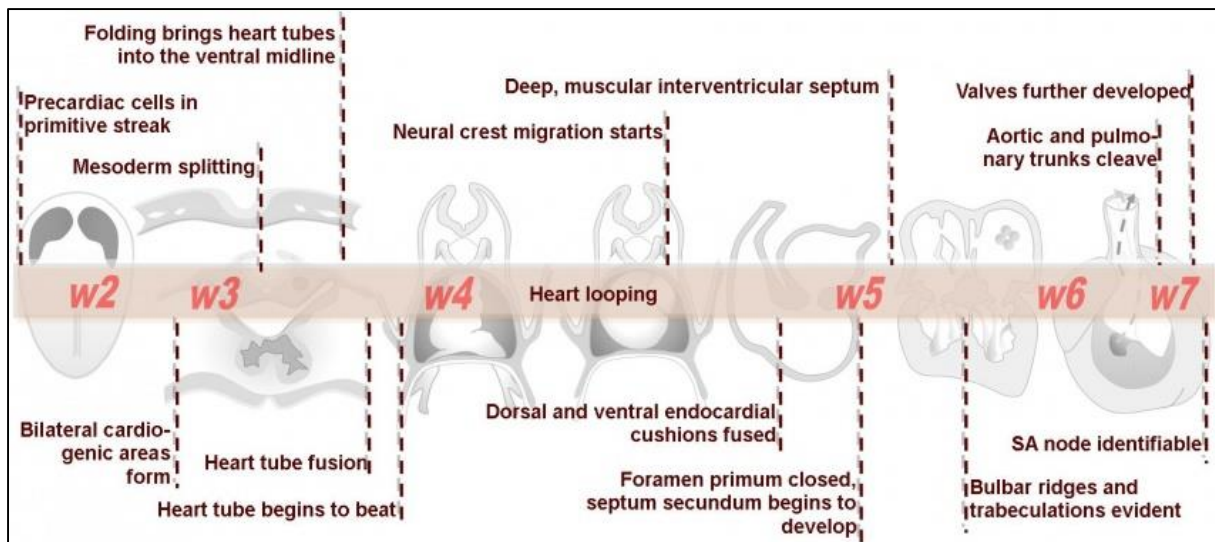


Figure 12: Résumé de la formation cardiaque chez l'homme

Les couches des organismes vertébrés s'organisent pendant la gastrulation en trois feuillets : l'endoderme (interne), l'ectoderme (externe) et le mésoderme (entre les deux). L'endoderme est à l'origine du tube digestif et de l'arbre respiratoire, l'ectoderme est à l'origine de la peau et du système nerveux, et le *mésoderme* est à l'origine de toute une variété d'organes dont le cœur. Plus précisément, le cœur est issu des « *lateral plate mesoderm* » qui évoluent aussi en sang et en vaisseaux sanguins gagnant les organes centraux et aussi les membres. Le système circulatoire constitue le premier système à fonctionner et le cœur, le premier organe à assurer son rôle. Ce schéma est similaire chez les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères. Les *progéniteurs cardiaques* se dirigent progressivement vers la ligne médiane dès la gastrulation puis pendant la neurulation. Les cellules se rejoignent de chaque côté, puis forment ensuite un tube composé par une couche myocardique externe et une couche endocardique interne. Le cœur ne constitue alors qu'un tube primitif mais présentant déjà la capacité de battre. C'est pendant cette période que la différenciation cardiomyocytaire a lieu. Il reste cependant difficile de retracer ce processus de différenciation qu'il est habituel, en fait, de subdiviser en *compétence*, *spécification*, *détermination* et seulement finalement, *différenciation*. C'est avant la différenciation finale que se perd la capacité de régénération myocardique, mais certains auteurs ont mis en évidence la capacité du cœur fœtal, y compris chez le mammifère⁸⁶, d'avoir une réponse régénératrice efficace contrairement à la situation adulte.

Grâce à cette approche embryologique, l'histoire du cardiomyocyte se précise. Les facteurs qui potentialisent la compétence et les facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la différenciation cardiomyocytaire pendant la phase de spécification, constituent autant de cibles potentielles pouvant intervenir dans la régénération cardiomyocytaire. Parmi les facteurs de transcription favorisant la cardiomyogénèse, *Nkx2-5*^{87, 88} et les protéines de la famille *GATA4/5/6*⁸⁹ semblent impliquées dans les processus de croissance pour le premier et de migration pour les deuxièmes. Citons aussi comme exemple les protéines de la famille *MEF 2* qui chez la drosophile, sont impliquées dans la spécification cardiogénique mais aussi musculaire squelettique⁹⁰ ce qui n'est pas complètement confirmé chez les mammifères. Ce très bref aperçu n'a que pour seul objectif de montrer l'importance des signaux et autres facteurs de croissance nécessaires à l'induction cardiomyogénique que nous devons découvrir pour mieux sélectionner les cellules au potentiel cardiogénique. Le contrôle de la prolifération des cardiomyocytes et l'étude de la différenciation en cardiomyocyte atrial ou ventriculaire, constituent aussi d'autres exemples que l'embryologie cardiaque permet de mieux appréhender.

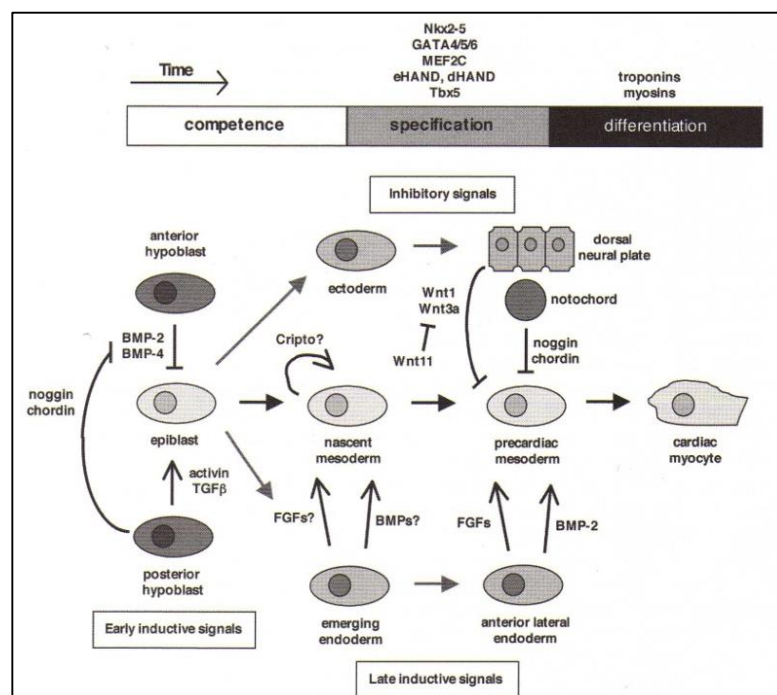


Figure 13: Schématisation de la cardiomyogénèse au cours du développement embryologique ; importance des signaux périphériques.

2. Des cellules souches dans le cœur adulte

Depuis maintenant quelques années, nous possédons des preuves concernant l'existence de cellules souches présentes dans le myocarde humain après la période fœtale ce qui a sérieusement ébranlé le paradigme de la non régénération myocardique. Les premières démonstrations de *chimérisme observé au sein des cœurs transplantés* par Quaini⁸⁴ nous orientaient clairement vers une origine extra-cardiaque des "néo-cardiomyocytes" mais de plus en plus de travaux suggèrent, eux, l'existence locale de véritables cellules souches ("*cardiac progenitor cells*" ou CPC) capables de proliférer et d'emprunter la voie de différenciation de la lignée cardiomyocytaire. L'équipe de Megeney⁹¹ fut la première à démontrer l'existence de telles cellules en étudiant le contingent cellulaire (moins de 1% des cellules cardiaques) capable d'exclure de son cytoplasme le colorant Hoechst 33342 (qui marque l'ADN) ce qui constitue une des propriétés des cellules souches d'organe grâce à une activité élevée de transporteurs membranaires cyto-protecteurs (ATP-binding cassette transporters)⁹². Peu de temps après, l'équipe d'Anversa⁹³ marqua nos esprits en décrivant la découverte d'une autre population cellulaire plus précisément caractérisée (pour l'essentiel C-Kit⁺, CD34⁻, CD45⁻, Lin⁻) par une petite taille par rapport à un cardiomyocyte adulte et relativement rare (1 pour 1000 myocytes). Ces cellules immatures ont pu être mises en cultures *in vitro* et ont montré leur capacité à emprunter la lignée cardiomyocyte mais aussi endothéliale.

Cependant, ces cellules conservaient un phénotype immature et surtout se sont montrées incapables, *in vitro*, d'avoir une activité contractile. Aussi, pour tester leur capacité de maturation finale en cardiomyocytes contractiles, des transplantations cellulaires dans le myocarde infarci ont été entreprises. Ces cellules ont alors exprimé des protéines sarcomériques ainsi que la connexine 43 et il fut aussi observé une prolifération capillaire. Comme d'habitude, la première objection émise concernait la possibilité de ces cellules à fusionner avec les cardiomyocytes adultes locaux. Il est bien évident que *la controverse concernant la fusion cellulaire dans toutes les expériences de thérapie cellulaire cardiaque demeure* et rend les débats parfois houleux. Néanmoins, face à cette objection, Anversa démontre que le contingent marqué des cellules transplantées ne suffit pas à expliquer l'ensemble des observations *in situ* et de plus, la plupart des "néo-cellules" *in situ* sont bien diploïdes et non tétraploïdes. D'autres types cellulaires ont depuis pu être isolés et candidats à de futures applications cliniques. L'un

d'entre eux exprimant le Stem Cell Antigen 1(Sca-1+, CD34-, CD45- plus précisément) exprime une activité télomérase reverse transcriptase fortement liée à l'auto renouvellement cellulaire⁹⁴, mais cette fois-ci encore une différenciation aboutissant en cardiomyocyte mature n'a pas encore pu être obtenue. Toujours est il que l'équipe de Bergmann⁹⁵ a même pu estimer *le taux de renouvellement cellulaire au sein du myocarde humain à environ 1% par an chez l'adulte jeune* alors qu'il diminue progressivement avec l'âge pour descendre sous la barre des 0,5% par an chez l'adulte plus âgé. L'origine "historique et géographique" précise de ces progéniteurs cardiaques n'en reste pas pour autant certaine, et les travaux de Quaini sur coeur transplanté, en restent une des plus belles illustrations⁸⁴. D'autres auteurs⁹⁶ ont montré que certaines cellules épocardiques possédaient des propriétés de différenciations vers diverses lignées impliquées dans la constitution cardiaque : cellules endothéliales, fibroblastes et même cardiomyocytes. Encore plus spectaculaire, Eisenberg⁹⁷ a mis en évidence la capacité de certains macrophages à se transdifférencier en cardiomyocytes adultes, expliquant peut-être par cette voie la potentialité thérapeutique de la fraction mononuclée des cellules de la moelle osseuse libérée en cas d'agression tissulaire cardiaque.

Finalement, à l'heure actuelle, les différentes cellules souches mises en évidence en intra-myocardique présentent des marqueurs antigéniques bien différents de ceux des cellules matures, mais le devenir phénotypique de ces cellules reste encore très controversé. Cependant, les expériences de mises en cultures de ces cellules progénitrices constituent une stratégie prometteuse de thérapie cellulaire. Notons qu'à ce sujet c'est l'équipe de Giacomello en 2004⁹⁸ qui rapporte en premier la possibilité d'isoler et de cultiver des cellules souches cardiaques à partir de simples biopsies endomyocardiques réalisées chez l'homme. Ce qui reste sûr et qui finalement fait du dogme faisant du cœur un organe différencié terminal une réalité clinique, c'est que la capacité de renouvellement des cellules cardiaques est totalement insuffisante en cas de lésion aiguë, comme lors de la survenue d'un infarctus par exemple, pour régénérer un myocarde contractile et fonctionnel.

3. Cytokines, facteurs de croissances, chémokines dans la cardiopathie ischémique et rôle dans le homing cardiaque.

La réponse inflammatoire est explosive en phase aiguë mais se poursuit tout au long de l'évolution de la cardiopathie ischémique ayant un impact variable dans le temps sur la cicatrisation post-lésionnelle. Le recrutement extra cardiaque de cellules progénitrices cardiaques est une autre voie de réparation tissulaire dont le principe réside dans l'appel à distance d'autres cellules par sécrétion de facteurs chimio-attractifs. Ce phénomène fortement intriqué au premier et principalement mis en évidence en post-ischémie aiguë⁹⁹, semble moins prépondérant en situation chronique.

A. Réponse en phase aiguë post-infarctus

La réponse inflammatoire qui caractérise l'infarctus aigu est particulièrement active et constitue un des déterminants de l'étendue de la lésion myocardique directement en rapport avec le pronostic de la maladie¹⁰⁰. Elle se traduit, pour le clinicien, par l'élévation du nombre total de globules blancs circulants. Mais depuis quelques années, certains auteurs ont mis en évidence une élévation spécifique de certains progéniteurs endothéliaux ainsi que de cellules souches hématopoïétiques pouvant témoigner d'une tentative de réponse à l'agression ischémique^{99, 101}.

La sécrétion tissulaire intense de cytokines en phase aiguë (avec un pic à une semaine environ) jouerait également un rôle dans la réparation ou tout du moins dans la cicatrisation tissulaire. Plus d'une dizaine de cytokines¹⁰² et facteurs de croissance ont été étudiés au sein du tissu lésé. Par exemple, le *TNF- α* (Tumor Necrosis Factor) et les Interleukines *IL-1 β* et *IL-6* ont été dosées à des taux jusqu'à 50 fois plus élevés dans la zone infarctée et même jusqu'à plus de 10 fois la norme dans le tissu sain environnant^{103, 104}. Leur taux est plus ou moins élevé en fonction de l'étendue de la lésion. La cause exacte de leur augmentation pourrait être liée à différents stimuli en plus de l'ischémie elle-même comme le stress mécanique¹⁰⁵ (par augmentation de la pression pariétale liée au dysfonctionnement cardiomyocytaire comme nous l'avons déjà évoqué) ou les radicaux libres de l'oxygène¹⁰⁶ par exemple. *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* et aussi *TGF- β* (Transforming growth factor) semblent faciliter la cicatrisation de l'infarctus en stimulant, entre autres, la phagocytose des débris nécrotiques et la synthèse de la cicatrice fibreuse qui, soulignons le ici, est vitale puisque sans elle la victime mourrait de rupture cardiaque quasi-

systématiquement...Les macrophages infiltrant le tissu ischémié en réponse à la sécrétion du MCP (monocyte chemoattractant protein) participeraient aussi à l'amplification du phénomène.

Dans la tentative de réparation myocardique de nombreux facteurs de croissance interviennent aussi probablement en suivant un timing précis^{107, 108}. Parmi les principaux, des facteurs tels *IL-3*, *IL-6*, *G-CSF* (Granulocyte-colony-stimulating factor), *HGF* (hepatocyte growth factor), *HIF- α* (hypoxia-inducible factor), *EPO* (erythropoietin), *VEGF* (vascular endothelial growth factor), et *TGF- β* semblent pouvoir favoriser la mobilisation cellulaire d'une part mais posséderaient aussi chacune un impact, par des mécanismes propres, sur la cicatrisation de la lésion. Par exemple, G-CSF diminuerait le remodelage ventriculaire en mobilisant les CSH et réduisant l'apoptose locale¹⁰⁹, HGF intervient dans l'angiogénèse et la mobilisation des CSM¹¹⁰, VEGF est lui aussi intimement impliqué dans l'angiogénèse et le recrutement des progéniteurs endothéliaux.

Enfin, nous citerons quelques chémokines qui semblent spécifiques de la réponse post-ischémique aiguë: CXCL8/IL-8 serait par exemple responsable de l'infiltration immédiate de neutrophile observé en cas d'infarctus aigu. Egalement intéressant dans le cadre de notre travail, l'axe *SDF-1* ou CXCL12 (Stroma cell-derived factor) -*CXCR4* tient un rôle particulier puisqu'il serait la médiation principale du homing cardiaque en phase aiguë¹¹¹.

B. Réponse en phase chronique post-ischémique

L'inflammation aiguë caractérise les premiers jours suivant l'infarctus aigu mais elle se perpétue et se chronicise, impactant directement le remodelage ventriculaire tardif. Alors que la sécrétion des cytokines et des facteurs de croissance en phase aiguë tend vers la limitation de la lésion ischémique, en phase chronique, certains de ces mêmes facteurs (TNF- α , IL-1, IL-6) tendent à aggraver les lésions myocardiques. Rauchhaus¹¹² a même pu montrer que leur dosage plasmatique était corrélé à la mortalité des malades et certaines conséquences macroscopiques ont maintenant été directement liées à leur activité. Par exemple, l'expression de l'IL-1 semble corrélée à la concentration de collagène tissulaire suggérant le rôle de cette cytokine dans le remodelage. D'autres cytokines auraient aussi un effet délétère sur la fonction ventriculaire par l'intermédiaire de l'activité NO¹¹³, elle-même entraînant une inhibition de la réponse β -adrénergique¹¹⁴. Le TNF- α , aurait lui un rôle prépondérant via l'altération de la matrice-

extracellulaire¹¹⁵ en entraînant une diminution du ratio MMP/TIMP (activité métalloprotéinase/activité inhibiteurs des métalloprotéinases) qui conduit *in fine* à l'augmentation du taux de collagène tissulaire.

En plus de l'activité délétère sur le remodelage ventriculaire, certains auteurs ont pu mettre en évidence que le taux de cytokines inflammatoires, telles le TNF- α et l'IL-6 en phase chronique, était directement lié au dysfonctionnement endothélial¹¹⁶. La réduction de la réponse aux cathécholamines et le dysfonctionnement du couplage électro-mécanique cardiomyocytaire sont, de manière moins démonstrative, d'autres voies par lesquelles l'inflammation chronique observée chez l'insuffisant cardiaque post-ischémique entretient l'aggravation de la pathologie.

La complexité des interactions entre les différents facteurs moléculaires, les cellules restantes et les cellules circulantes permettent d'entrevoir la complexité que nous devrions atteindre dans l'explication du potentiel thérapeutique de certaines cellules souches

4. La CSM: des propriétés uniques mais une candidate parmi tant d'autres

Les travaux précités ayant mis en exergue le rôle particulier des cellules souches mésenchymateuses dans la réparation tissulaire, en ont fait une candidate privilégiée pour la médecine régénératrice dont la place s'affirme de plus en plus, notamment dans le domaine ostéo-articulaire. Dans le domaine de la cardiopathie ischémique, comme nous l'avons déjà rappelé, les extraordinaires propriétés paracrines représentent aujourd'hui leur plus bel atout pour séduire l'expérimentateur, plus encore que leur plasticité multipotentielle. Loin d'être encore résolue, la compréhension des propriétés liées aux CSMs dans la réparation tissulaire constituera, à terme, une des clefs qui fera de la cellule candidate la préférée des thérapeutes de la cardiopathie ischémique.

Plusieurs travaux nous encouragent dans ce choix. En effet, lorsqu'elles sont perfusées par voie intra-veineuse périphérique, des CSMs ont été identifiées dans plusieurs organes artificiellement lésés: dans le cerveau embryonnaire¹¹⁷ ou adulte¹¹⁸, dans le myocarde infarci¹¹⁹,

¹²⁰ comme nous l'avons déjà signalé précédemment, dans le muscle squelettique blessé¹²¹, et dans le rein¹²². Signalons tout de suite qu'en cas de perfusion intra-veineuse en l'absence de lésion organique artificiellement provoquée, les CSMs se retrouvent dans de multiples organes comme les poumons, le foie, les reins et la rate. Des expériences ont aussi montré que la mise en culture *ex vivo* modifiait *per se* les propriétés des CSMs puisque, par exemple, des CSMs fraîchement prélevées et réinjectées dans la circulation sanguine pouvaient se rediriger préférentiellement vers la moelle osseuse, ce qui n'est pas le cas pour les CSMs mises en cultures et secondairement réinjectées¹²³. Les lésions attractives pour les CSMs peuvent être d'origines mécaniques mais aussi inflammatoires et tumorales. Ces travaux de perfusion de CSMs n'expliquent cependant pas la situation réelle *in vivo*.

La controverse de la véritable nature *in vivo* des CSMs peut nous éclairer sur certains points en particulier la discussion concernant *le lien existant entre péricytes et CSMs*. De nombreuses observations sont venues étayer l'hypothèse selon laquelle les péricytes, parfois appelées cellules de Rouget, constitueraient un des pools *in vivo* des CSMs. Les péricytes sont des cellules au contact des cellules endothéliales des artérioles, capillaires et veinules, impliquées dans la stabilité des micro-vaisseaux, la synthèse de matrice extra-cellulaire et l'immunité locale (action *macrophage like*). Le microenvironnement micro-vasculaire, plus précisément péri-vasculaire, pourrait constituer une des niches des CSMs. Lors d'une lésion périphérique, des signaux pourraient alors entraîner la division asymétrique des CSMs entraînant dans le flux sanguin des cellules souches vers l'organe cible. Ces CSMs pourraient être des péricytes, prêts à passer dans la circulation grâce à leur proximité géographique. Rappelons aussi le travail de Chang¹²⁴ qui a rapporté en 2008 que les protéines exprimées au cours de l'infarctus du myocarde aigu pouvaient induire l'expression de marqueurs cardiomyocytaires retrouvés chez des CSMs aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (l'auteur rajoutait alors des variations de pression pour mieux mimer la situation réelle). Enfin, pour que la greffe cellulaire ou tissulaire ne reste pas qu'un transfert de cellules, des preuves de l'intégration aux tissus hôtes sont nécessaires et en particulier au niveau cardiaque, la réalité d'un couplage électro-mécanique (*gap junctions*). Dans ce domaine encore, *les CSMs ont montré leur capacité à établir des connexions avec les cardiomyocytes locaux par l'intermédiaire de la connexine 43*¹²⁵.

C'est pourquoi, plus que tout autre cellule, la pluripotentialité des CSMs et leur implication dans la réparation tissulaire et organique, leur facilité d'obtention et leur innocuité

apparente, constituent des arguments solides pour en faire une candidate, si non idéale, tout du moins favorite. Néanmoins, la CSM ne fait en aucun cas actuellement l'unanimité quant au fait d'être "LA cellule" pour réparer le cœur, et rappelons ici que la thérapie cellulaire cardiaque regroupe un ensemble de techniques biologiques dont le seul point commun est finalement l'utilisation d'un type ou d'un groupe cellulaire ayant un rôle plus ou moins identifié dans la réparation tissulaire. Si la cellule embryonnaire reste la cellule la plus prometteuse, et pour cause, c'est la seule dont les preuves de différenciation en cardiomyocytes fonctionnels atteignent un niveau scientifiquement peu réfutable, de multiples cellules ont été testées dans les mêmes objectifs. Depuis plus d'une décennie, chez l'animal, les cellules étudiées ont été principalement les cellules souches embryonnaires (cellules ES) comme nous l'avons déjà écrit, les cellules souches hématopoïétiques (HSC), les cellules souches mésenchymateuses (CSM)^{126, 127}, les cellules progénitrices endothéliales (EPC) et les cellules souches cardiaques (CSC)¹²⁸. En clinique, mais bien entendu aussi chez l'animal, les cellules les plus souvent étudiées ont été les myoblastes d'origine squelettique¹²⁹, les cellules progénitrices endothéliales circulantes¹³⁰, et les cellules mononucléées (CMN) d'origine médullaire plus ou moins sélectionnées¹³¹. Chaque type cellulaire répond à des définitions et à des conditions de culture particulières. L'expression de certains marqueurs de surface, la possibilité de transcrire certaines protéines et bien entendu leur capacité de se différencier en différents types cellulaires, plus ou moins compétant dans la cardiogénèse, multiplient les possibilité de stratégie thérapeutique et permet d'entrevoir même une croissance exponentielle des potentialités si on envisage les possibilités de co-cultures cellulaires. Plus récemment encore, l'intérêt est devenu croissant quant à l'utilisation des cellules issues du cordon ombilicales et les cellules souches induites pluripotentes (iPSCs)¹³². Les travaux concernant le reprogrammation cellulaire devrait aussi accroître les pistes. Finalement, les comparaisons entre toutes ces différentes cellules pourraient bien se multiplier ces prochaines années. Notons que dans ce domaine, Van der Bogt fut le premier à se lancer dans une comparaison rigoureuse entre quatre types cellulaires différents (cellules mononucléées vs myoblastes squelettiques vs cellules mésenchymateuses vs fibroblastes) dans le traitement de l'IDM chez des souris ligaturées et les gagnantes furent les mononucléées quant au critère de survie post-implantation¹³³.

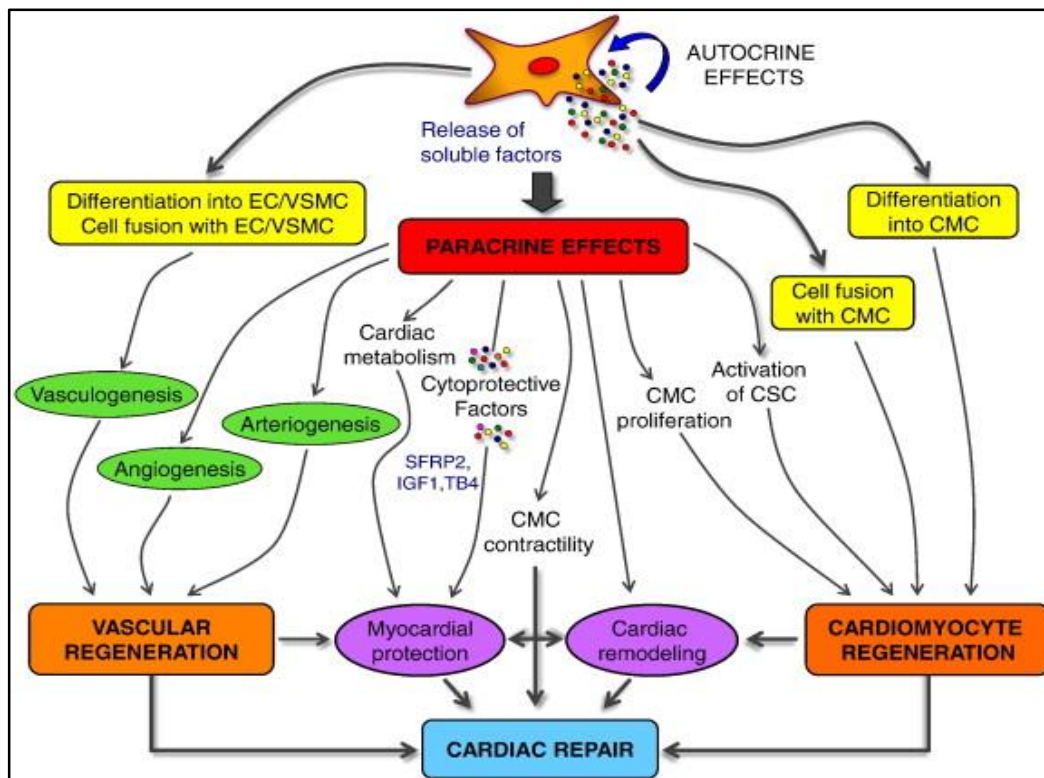


Figure 14 : Schéma synthétiques sur les différentes voies thérapeutiques pouvant être liées à l'action des CSMs dans la réparation cardiaque selon Gnecci¹³⁴.

5. Réparation chirurgicale: de la réparation macroscopique à l'ingénierie tissulaire

In extremis, toute action chirurgicale cardiaque est une thérapie cellulaire et/ou un acte d'ingénierie tissulaire. Néanmoins, nous distinguons aisément l'approche chirurgicale dont l'objet de travail reste macroscopique voire millimétrique (dans le cas de la réalisation des pontages) alors que l'approche proposée par la thérapie cellulaire se base sur la réparation à partir d'une "brique" cellulaire. Pourtant, c'est bien le même objectif de réparation micro et macroscopique qui est entrepris et pour notre part nous nous inspirons directement de certaines techniques de chirurgie cardiaque dont l'objectif est le remodelage inverse du ventricule gauche.

D'ailleurs, cette parenté se reflète même dans la terminologie. En effet, avant l'avènement de l'ère de la médecine régénérative cardiaque, le terme de « cardiomyoplastie » désignait pour le chirurgien cardiaque, avant tout, une intervention mise au point par Chachques^{135, 136} dans les années 80, dont le principe reposait (1) d'une part sur le remodelage ventriculaire direct de la masse ventriculaire à l'aide de l'utilisation pédiculée du muscle grand dorsal et, (2) d'autre part, sur l'utilisation d'une synchronisation du muscle cardiaque natif avec le muscle squelettique (à l'aide de l'implantation *in situ* d'électrodes de pacemaker) qui progressivement subissait une transformation myofibrillaire vers un tissu infatigable oxygéné-dépendant. Le passage de la "*cardiomyoplastie dynamique*" à la "*cardiomyoplastie cellulaire*" suit finalement un continuum dans la réparation myocardique et il n'est pas étonnant que ce soit le même groupe qui devint pionnier dans l'une comme dans l'autre de ces approches. En 2008, cette double approche, cellulaire et chirurgicale, permet au même groupe de l'HEGP de proposer chez l'homme le traitement de zones infarctées chroniques par l'application chirurgicale directe d'une matrice enrichie par des cellules mononucléées de moelle osseuse¹³⁷. L'étude MAGNUM¹³⁷, réalisée sur la comparaison de 20 patients insuffisants cardiaques post-ischémiques, montre ainsi que cette approche permet d'augmenter l'épaisseur du myocarde infarcté et améliore la fonction diastolique sans aucun effet secondaire observé.

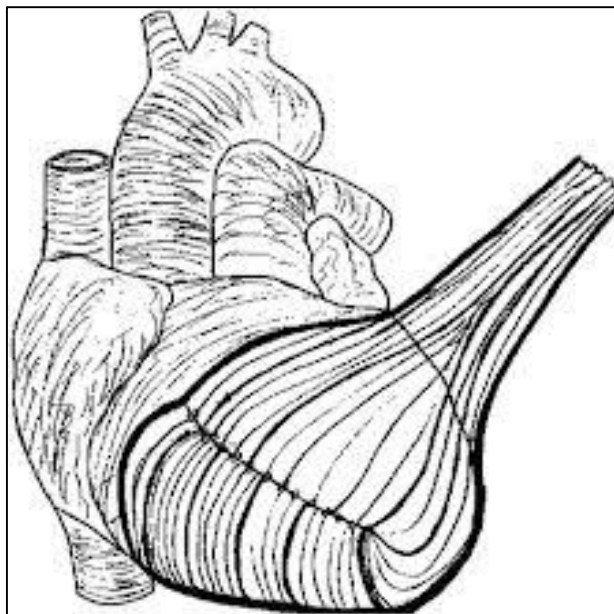


Figure 15 : Cardiomyoplastie avec le grand dorsal selon Chachques¹³⁶.

D'autres tentatives de remodelage ventriculaire inverse ont été proposées notamment dans le cadre du traitement des anévrismes ventriculaires gauches¹³⁸ et/ou dans les cardiopathies dilatées¹³⁹. Si certaines approches ont apporté la preuve de leur bénéfice clinique, d'autres, comme l'intervention de Batista, suscitent encore quelques interrogations et soulignent, de notre point de vue, les limites des "approches macroscopiques classiques". La réduction myocardique volumétrique dans le but de réduire la pression intraventriculaire gauche et par conséquent la consommation d'O₂, ne résiste ni à l'analyse physiopathologique, ni à l'épreuve clinique. Pour être bref, il nous semble que sans l'intégration d'une dimension métabolique cellulaire (garant de la production énergétique mécanique), les approches "macro-chirurgicales" proposant une reconstruction purement morphologique, se heurtent à la nature même du tissu à réorganiser et à l'objectif fonctionnel de ces thérapies. En d'autres termes, nous pensons que la combinaison des deux approches, chirurgicales et cellulaires, ne doivent pas s'éloigner l'une de l'autre. De ce point de vue, l'ingénierie tissulaire cardiaque pourrait constituer une sorte de synthèse intégrant la vision micro-architecturale du biologiste à celle plus large mais parfois trop empirique du chirurgien.

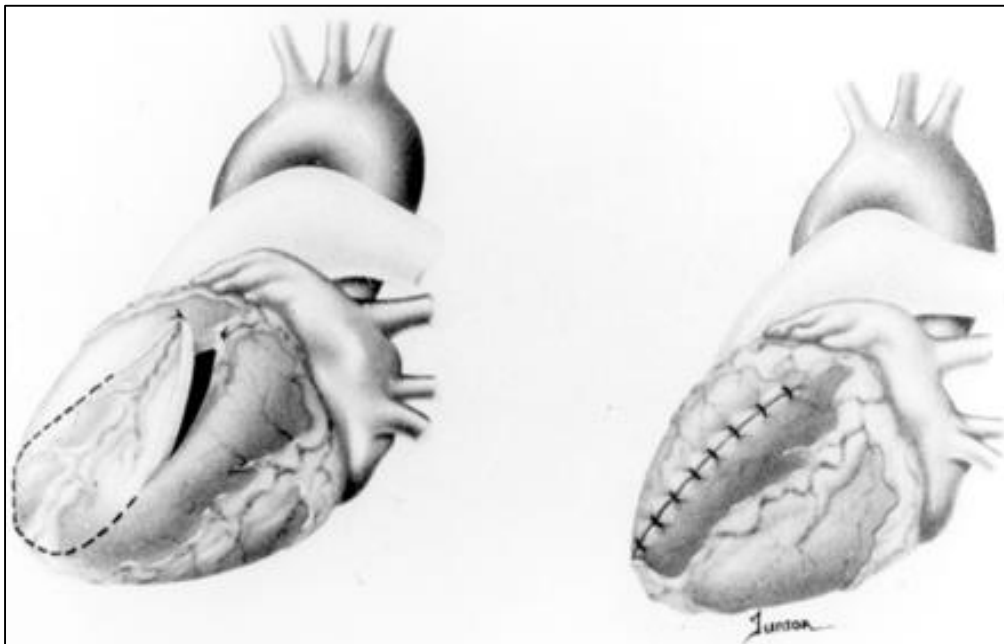


Figure 16 : Intervention de Batista

6. Des données expérimentales prometteuses et des données cliniques rassurantes.

Il n'est pas question ici de faire une revue exhaustive des différents travaux expérimentaux et même cliniques dont l'objectif était de mesurer les effets de la thérapie cellulaire et/ou ingénierie tissulaire, compte tenu de l'accroissement véritablement exponentiel du nombre de publications internationales aujourd'hui disponibles. A la fin des années 90 et au début des années 2000, de nombreuses études expérimentales ont mis en avant la possibilité de réparer le tissu cardiaque lésé post-ischémique. Parmi les travaux les plus influents, nous avons été marqués par les travaux d'Orlic⁸ et de Tomita^{140, 141}. Peu à peu, différents types cellulaires furent testés dans diverses conditions. Quasiment à chaque fois, assez curieusement, preuve était faite de leur efficacité thérapeutique chez le petit et le gros animal.

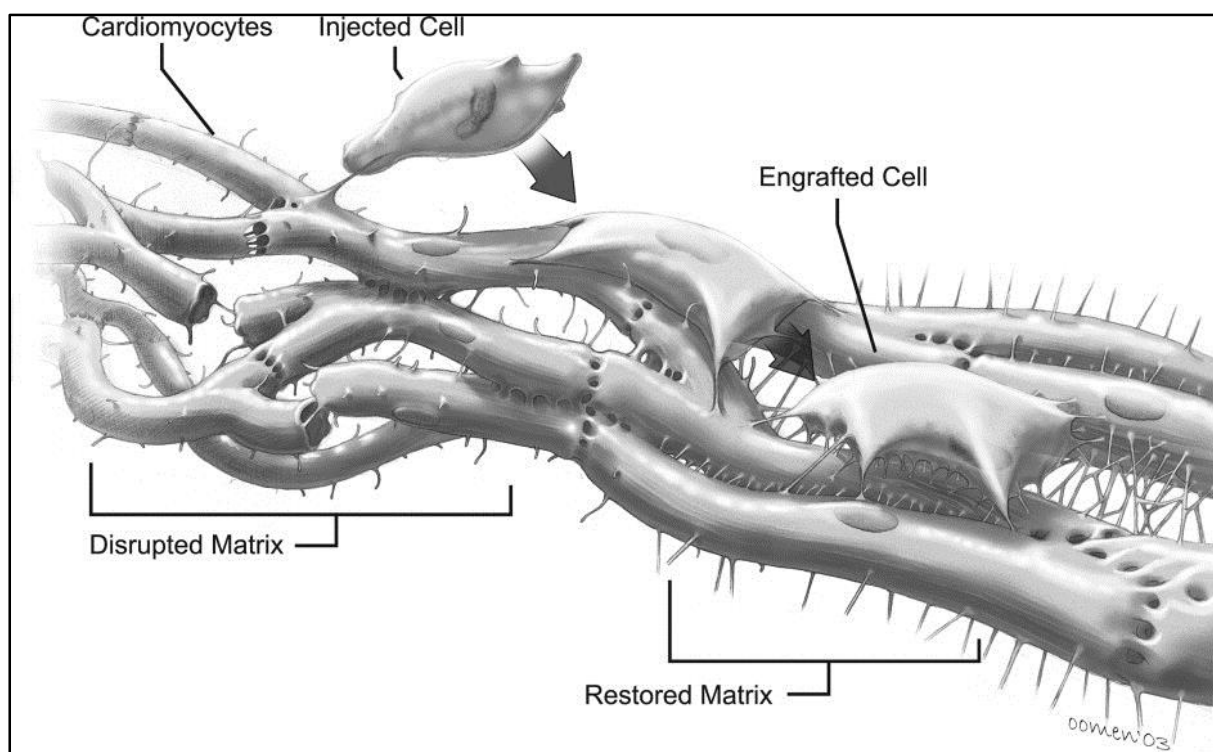


Figure 17 : Vision hypothétique de la greffe cellulaire selon Fedak¹⁴².

A. Thérapie cellulaire cardiaque dans l'IDM chronique

Les études animales et les essais cliniques sont singulièrement moins nombreux dans le cadre de la cardiopathie ischémique, comparés à ceux réalisés dans le cadre de l'infarctus aigu. De nombreuses revues sont disponibles concernant la thérapie cellulaire appliquée à la cardiopathie ischémique, mais peu se consacrent exclusivement à la phase chronique de l'infarctus. Réinsistons d'emblée sur la multitude de stratégies thérapeutiques envisagées, notamment en ce qui concerne le choix de la "cellule-médicament". Les CSMs, vers lesquelles nous nous sommes orientées, ne constituent donc qu'une approche parmi d'autres pour laquelle il reste difficile d'établir une hiérarchie d'efficacité tant le nombre de paramètres à contrôler pour une comparaison objective est élevé.

Rappelons tout de même, qu'il revient à l'équipe de Tomita¹⁴⁰ d'avoir réalisé la première transplantation intramyocardique de cellules autologues de moelle osseuse dans la zone cicatricielle de l'infarctus myocardique chez le rat. Quatre semaines plus tard, les auteurs ont noté une différenciation en fibroblastes mais aussi en cellules musculaires avec quelques caractéristiques cardiaques (*cellules cardiac-like*). Une expérience similaire retrouve des résultats positifs en réalisant la transplantation en phase chronique chez le porc¹⁴¹. De nombreux auteurs rapportent des effets bénéfiques sur la perfusion et la fonction cardiaque alors que les protocoles utilisés n'ont souvent que pour seul point commun l'objectif de régénérer du myocarde...Les hypothèses concernant la transdifférenciation des cellules souches d'origine médullaire se multiplient: *différenciation par contact cellulaire, stimulation de voies de différenciation vers la cardiogénèse, recrutement de cellules souches cardiaques*...Les discussions restent ouvertes d'autant plus que la capacité des cellules transplantées à établir des connexions intercellulaires ne permet pas d'enterrer définitivement la possibilité de fusion cellulaire. Toujours est-il que rapidement, l'absence de preuves formelles, excepté en cas d'utilisation de cellules embryonnaires ou de cellules cardiaques fœtales, concernant la différenciation en *cardiomyocytes fonctionnels* (c'est à dire contractiles) conduit à soumettre différentes hypothèses pour expliquer les effets attendus. La *stimulation de l'angiogénèse locale* et le rôle des cellules dans la *réorganisation du micro-environnement architectural* redonne au

partisan de l'efficacité de la cellule souche mésenchymateuse des pistes de recherche régulièrement enrichies. Dans notre laboratoire, l'amélioration de la perfusion à la suite d'une transplantation épocardique de CSM chez le rat a aussi été observée et soutenue par une méthodologie d'analyse de la perfusion objective. Il persistait néanmoins des doutes quant à l'analyse de nos données liés à la méthodologie employée. En effet, si le choix de la transplantation chirurgicale directement dans le cœur infarcté par la voie épocardique semblait le plus "simple", dans le but d'atteindre le tissu cible, nous avons bien conscience, que l'intervention elle-même constituait une agression chirurgicale devant stimuler une réaction inflammatoire, elle-même pouvant induire, momentanément du moins, une augmentation de la perfusion locale secondairement aux effractions provoquées par l'aiguille elle-même dans le myocarde. C'est pour répondre à cette interrogation que nous avons conduit un travail dont l'objectif était d'étudier l'effet à long terme de la transplantation des cellules CSM dans le cœur infarcté. Cette étude fait l'objet d'une publication que nous présentons à la suite de cette partie (**article 1**). Ce travail a permis de montrer qu'il existait effectivement une réaction inflammatoire non spécifique initialement, mais les résultats à long terme (à 6 mois) eux, confirment le bénéfice de la transplantation des CSM en particulier sur les zones bordantes.

Les données cliniques sont, elles aussi, très disparates mais nous rapportons principalement cette fois-ci des résultats d'études où les cellules mononucléées de moelle osseuse ont été utilisées, car (1) d'une part, ces études sont plus nombreuses et bien mieux documentées que celles n'utilisant qu'exclusivement la fraction mésenchymateuse des cellules et (2) d'autre part, nous pouvons considérer que l'utilisation de l'ensemble des mononucléées constituent une sorte de première étape avant l'utilisation de fractions cellulaires "purifiées". En 2005, l'équipe de Strauer¹⁴³ rapporte les résultats d'une étude non randomisée consistant à étudier l'impact de la perfusion intra-coronaire de cellules mononucléées provenant de la moelle osseuse vers des zones victimes d'un infarctus aigu 5 mois plus tôt. L'étude conclut en une réduction de la taille du myocarde infarcté associé à une amélioration de la FEVG. En 2006, Assmus¹⁴⁴ renforçant la méthodologie de son essai clinique démontre lui-aussi un bénéfice de l'implantation de cellules souches par perfusion intra-coronaire mais aussi par perfusion périphérique! Le bénéfice était lui aussi noté concernant l'amélioration de la FEVG globale avec en particulier une amélioration de la contractilité dans les territoires cibles. Plus récemment, l'équipe de Strauer une nouvelle fois¹⁴⁵, rapporte de nouveau des résultats encourageants dans

une étude non randomisée présentant plus de 5 ans de recul (étude STAR) et qui a pour mérite essentiel de démontrer l'innocuité de cette stratégie.

En fait dès 2001, certains auteurs^{146, 147} ont pu tester l'injection intra-myocardique dans des zones ischémiées réfractaires à tout autre traitement, soit par injections cellulaires épicaudiques directes soit par injections endocardiques par voie endovasculaire. Ils trouvèrent une amélioration symptomatique pour les patients ainsi qu'une légère amélioration de la perfusion sans retrouver d'amélioration significative de la fonction globale. Profitant de l'enthousiasme suscité par les premiers résultats expérimentaux que nous avons pu nous même reproduire ainsi que les quelques résultats cliniques alors à disposition, nous avons proposé, dès 2006, un travail de recherche clinique qui a été accepté dans le cadre d'un PHRC (Projet Hospitalier de Recherche Clinique). Le détail de la méthodologie et des résultats de ce travail sont présentés dans une publication qui fait suite à cette partie (**article 2**)¹³. Entre temps, d'autres résultats cliniques furent publiés confirmant une amélioration modeste, certes, mais significatives des certains paramètres comme la perfusion et la fonction cardiaque globale^{148, 149}.

Concernant les CSM plus particulièrement, elles ont aussi été étudiées en phase aigüe¹⁵⁰ et en phase chronique¹⁵¹. Dans les deux situations, administrées par voie intra-coronaire, les CSM semblaient être liées à une amélioration significative de la FEVG. Citons enfin les travaux encore en cours APOLLO et PRECISE, cherchant à évaluer les CSM issues du tissu adipeux autologue.

B. Ingénierie tissulaire cardiaque dans le traitement de l'IDM chronique.

L'ingénierie tissulaire cardiaque est la conception ex vivo d'un tissu tridimensionnel façonné dans le but de remplacer, de réparer ou plus simplement de soutenir la fonction du myocarde lésé. On définit classiquement ce concept par une triade qui comprend : (1) une matrice d'origine organique ou bio-synthétisée, (2) des cellules qui permettent la cohésion de la charpente et (3) des facteurs régulateurs qui influencent les interactions entre la matrice et les cellules. Ces facteurs peuvent être simplement les facteurs contenus dans le milieu de culture

initial, mais ils peuvent aussi être rajoutés à différents moments de la conception du néo-tissu. Ils sont d'origine chimique (hormones, cytokines, facteurs de croissance par exemple) ou bien mécanique. Dans le cadre du traitement des cardiopathies, nombre d'auteurs tentent de concevoir *un tissu cardiac-like* en ajoutant un facteur mécanique mimant la contraction ventriculaire.

Dès la fin des années 50', la possibilité de concevoir un tissu cardiaque ex vivo fut envisagée¹⁵². Mais la première expérience d'ingénierie tissulaire cardiaque telle que nous l'entendons maintenant, a été rapportée par Leor et al. en 2000¹⁵³. L'auteur a isolé des cellules cardiaques et les a incluses dans une matrice d'alginate. La greffe avait été réalisée sur un IDM de 7 jours. Les coupes histologiques ont révélé des fibres myocytaires bien organisées, des gap junctions et ainsi que des néo-vaisseaux (capillaires). L'examen, révélait aussi la présence de fibroblastes, de macrophages et de lymphocytes. Quasiment en même temps, Fink et Eschenhagen¹⁵⁴ ont proposé l'utilisation de collagène de type I sous forme liquide pour créer un tissu présentant une disposition tridimensionnelle des cellules. Par la suite, il a été démontré que des cardiomyocytes immatures pouvaient s'organiser en tissu cardiac-like in vitro¹⁵⁵. Zhao¹⁵⁵ propose de réaliser des moules permettant au tissu gélifié d'adopter la forme désirée puis de transférer le nouveau tissu dans un appareil entraînant « un stretching » simulant l'activité contractile afin d'induire une mécano-transduction. Zimmermann, en 2006^{156, 157} rapporta lui aussi des résultats très prometteurs en utilisant des cœurs néonataux de rats. Ce tissu ainsi synthétisé forme des couches musculaires lorsqu'il est implanté sur un IDM de rat immunosupprimé. De plus, dès la 4^{ème} semaine, il fut mis en évidence un couplage électromécanique entre le tissu greffé et le tissu hôte, sans induction évidente d'arythmie.

Mais surtout, de notre point de vue, l'avantage essentiel de l'approche tissulaire comparativement à l'approche cellulaire, est le fait, qu'il n'est pas indispensable, d'attendre une intégration complète et harmonieuse du tissu néoformé, c'est-à-dire viser l'intégration et/ou la différenciation cardiomyocytaire et le couplage électro-mécanique. En effet, l'ingénierie tissulaire se donne aussi pour objectif la prévention de la dilatation ventriculaire et l'augmentation de l'épaisseur ventriculaire qui sont deux phénomènes étroitement liés à l'évolution délétère du remodelage ventriculaire. Ces bénéfices pourraient limiter la dégradation fonctionnelle et même améliorer la contractilité. Quelques travaux sont particulièrement prometteurs comme par exemple ceux de Guo et al. en 2006^{158, 159} qui ont mis au point un tissu à partir de cellules ES de souris, mélangées à une matrice de collagène. Ce

tissu, mécano-induit in vitro a montré une évolution structurelle et fonctionnelle très proche du muscle cardiaque natif. Dans ce cadre, les CSMs sont particulièrement intéressantes par leur facilité d'isolement et de multiplication in vitro. Miyahara¹⁶⁰ a montré que l'utilisation d'une matrice avec une mono-couche de CSMs issues du tissu adipeux permettait d'inverser le remodelage en augmentant l'épaisseur ventriculaire. Chen¹⁶¹ a développé lui une matrice de péricarde bovin acellulaire, poreux, qu'il a rempli avec des CSMs. Les rats syngéniques victimes d'un IDM amélioreraient leur fonction ventriculaire par l'application de ce traitement. Ex vivo, il a déjà été conçu, par Wei¹⁶², une matrice en 3D implantée avec des CSMs qui forment un tissu cardiac-like viable multicouche. De plus, ces patches ont démontré qu'ils induisaient une véritable myogénèse ainsi qu'une angiogénèse par l'intermédiaire d'un accroissement de l'action des cytokines et des facteurs de croissance¹⁶¹. Enfin, je citerai le travail de Simpson¹⁶³ qui nous a fortement influencé, ou plutôt devancé, puisqu'il a conçu en premier un patch à partir de CSMs d'origine humaine placée dans une matrice de collagène de type I, et appliqué sur le versant épigardique de rats infarctés ligaturés.

En définitive, nous manquons actuellement de preuves formelles concernant l'impact bénéfique des CSMs dans le cadre de l'infarctus chronique, et par ailleurs les mécanismes mis en causes restent largement débattus justifiant l'intérêt théorique de l'initiation de notre expérience chez le petit animal dans la contribution de cette thématique évolutive.

Deuxième partie: TRAVAUX REALISES

I. ETUDE DE LA PERFUSION MYOCARDIQUE CHEZ LE RAT APRES TRANSPLANTATION EPICARDIQUE DE CSM (Article 1).

Résumé :

Dans ce travail, nous voulions étudier l'impact de la transplantation des CSM au sein du myocarde infarcté jusqu'au 6^{ème} mois post-opératoire. Pour ce faire, nous avons conduit une étude comparative entre un groupe de rats témoins (groupe T, n = 7) présentant un infarctus du myocarde chronique (IDMc) induit par ligature coronaire chez qui nous avons injecté du sérum physiologique et un groupe de rat présentant un IDMc traité par une injection de CSM marquées à l'¹¹¹In-Oxine, en plein milieu de l'infarctus, par voie épicardique (groupe Th.Cell, n = 7). Le contrôle de la répartition des CSM injectées était effectué grâce à une tomoscintigraphie à double acquisition SPECT In¹¹¹/Tc^{99m} et nous pûmes ainsi définir la zone IDMc précisément traitée. La fonction ventriculaire et la perfusion tissulaire étaient évaluées par Tc^{99m}-Sestamibi pinhole gated-SPECT itérativement pendant les 6 mois. Dès la 48^{ème} heure après injection, nous avons mis en évidence une augmentation de la perfusion tissulaire des zones infarctées dans les deux groupes, suggérant le rôle d'une inflammation aigüe liée à la procédure chirurgicale. Au 6^{ème} mois, cette amélioration persistait dans le groupe Th.Cell mais seulement au sein des segments initialement hypoperfusés bordant la zone injectée (+10±5%), alors que la perfusion diminuait dans toutes les segments infarctés du groupe T. Nous n'avons pas mis en évidence de différence quant à la fonction ventriculaire gauche. Cette étude confirme que (1) l'implantation de CSM est liée à une amélioration de la perfusion tissulaire en cas d'IDMc et (2) ce bénéfice persiste au 6^{ème} mois au voisinage de la cible injectée, suggérant une action paracrine des cellules implantées.

II. THERAPIE CELLULAIRE DANS L'INFARCTUS CHRONIQUE CHEZ L'HOMME: RESULTATS CLINIQUES (Article 2)

Résumé:

Dans ce travail clinique randomisé qui a pu être réalisé dans le cadre d'un PHRC, nous cherchions à démontrer l'impact bénéfique de l'injection de cellules mononucléées de moelle osseuse autologue (CMN) au sein d'un infarctus chronique sévère (IDMc). 14 patients présentant un IDMc défini par SPECT-sestamibi (fixation < 50%) et devant par ailleurs tous bénéficier de pontages coronaires, ont été répartis en un groupe témoin (groupe T, n = 7) et un groupe bénéficiant de la thérapie cellulaire par injection cellulaire épicaudique (groupe Th.Cell, n = 7). Les patients ont bénéficié d'un suivi clinique, rythmologique (implantation d'un dispositif REVEAL®), échographique ainsi que par des examens SPECT, PET (/FDG) et IRM jusqu'au 6^{ème} mois post-opératoire. Les segments IDMc du groupe Th.Cell (+6,8±5%) étaient mieux perfusés au 6^{ème} mois comparativement au groupe T (+1,0±4%). Néanmoins, *l'analyse patient par patient* a révélé que cette amélioration concernait principalement 3 patients traités. Les IDMc de ces patients fixaient d'avantage le FDG (59±9% vs 38±8%) et leur extension transmurale en IRM était plus faible (40±6% vs 73±18%) comparativement aux autres patients du groupe traité. Cette étude confirme l'innocuité de cette approche thérapeutique à moyen terme. Par ailleurs, ce travail met en évidence que l'amélioration de la perfusion liée à l'injection cellulaire dépend de la viabilité résiduelle de la zone identifiée comme IDMc. Au contraire, les zones plus sévèrement nécrosées, ne semblent pas répondre à cette stratégie.

III. TRAITEMENT DE L'INFARCTUS CHRONIQUE DU MYOCARDE PAR UN PATCH REALISE A PARTIR DE CSM AUTOLOGUES CHEZ LE RAT (Article 3)

Résumé:

Dans ce travail, nous voulions étudier la contribution d'un patch (conçu à partir d'une matrice de collagène de type I dans laquelle des CSM ont été incluses) directement greffé à la surface d'un infarctus chronique transmural (IDMc) dans le remodelage ventriculaire. Un IDMc a été induit par ligature coronaire chez 20 rats, puis authentifié par un examen ^{99m}Tc -sestamibi pinhole gated-SPECT. Après randomisation, un groupe témoin (groupe T, $n = 10$) a été comparé à un groupe traité par le patch (groupe P, $n = 10$). Avant la greffe, nous avons étudié l'impact du collagène sur le devenir phénotypique des CSM. Les CSM contenues dans le patch ont été marquées à ^{111}In -Oxine et l'implantation du patch a donc pu être contrôlée par une double acquisition $^{99m}\text{Tc} / ^{111}\text{In}$ -SPECT. Quatre semaines plus tard, la contribution du patch a été évaluée par SPECT, par mesure hémodynamique ainsi que par l'analyse immunohistochimique du myocarde IDMc. La matrice 3D de collagène a ralenti la croissance des CSM mais n'a modifié ni leur phénotype, ni leur potentialité. Le patch a bien intégré la zone d'IDMc. Chez les rats traités, la perfusion des segments IDMc s'est accrue ($64 \pm 4\%$ vs $49 \pm 3\%$, $p = 0,02$) et la contractilité globale du ventricule gauche (dp/dt max et dp/dt min) s'est améliorée. Les coupes histologiques ont montré un épaississement de la paroi ventriculaire ($1,75 \pm 0,24$ vs $1,35 \pm 0,32$ mm, $p < 0,05$). Au sein des territoires initialement IDMc du groupe P, les tests immunohistochimiques ont révélés une nette augmentation de l'angiogénèse dans un tissu myofibroblastique. La greffe épicaudique d'un patch en collagène-3D de CSM contribue au remodelage inverse du ventricule gauche.

**Troisième partie: DISCUSSION, PERSPECTIVES,
CONCLUSION**

I. DISCUSSION

Le traitement de l'infarctus chronique du myocarde constitue donc l'une des grandes ambitions de la médecine régénératrice à laquelle nous avons tenté de participer par ces différents travaux. Les résultats de chacune de ces études ont été clairement encourageants. Cependant, les limites de ces approches, notamment concernant l'analyse du devenir phénotypique des CSMs transplantées, ne nous ont pas permis de consolider nos spéculations à propos de leurs actions présumées. Néanmoins, deux aspects communs aux travaux précliniques et cliniques peuvent être soulignés:

(1) *La thérapie cellulaire cardiaque utilisant les CSMs peut avoir un effet bénéfique sur la perfusion tissulaire mais aussi sur la fonction ventriculaire gauche dans le traitement de l'IDM chronique dans le cas de l'utilisation du patch.* Grâce à l'utilisation de la méthodologie SPECT appliquée chez le petit animal, nous avons su, en particulier, décrire précisément et de façon reproductible, l'extension et le degré de cet infarctus chronique avant et après traitement. Chez l'homme, cette analyse a été multimodale et aussi complète que nous le permettent nos outils disponibles en clinique. Cette approche multiple nous a permis de mettre en évidence, de façon assez précise, que *l'efficacité de la thérapie cellulaire dépendait de l'activité métabolique résiduelle de la zone cible.*

(2) Les 3 études ont montré *l'innocuité de ces stratégies thérapeutiques* (principalement : absence de troubles du rythme, absence d'ossification ou de calcification tout du moins et absence d'évolution tumorale).

En fait, en thérapie cellulaire et/ou ingénierie tissulaire plus particulièrement, le premier des *leitmotiv* des expérimentateurs reste celui de la survie du transplant¹⁶⁴, condition *sine qua non* sans laquelle les effets réparateurs estompés ne pourraient s'initier. La survie est elle-même conditionnée par la méthodologie de délivrance du substrat thérapeutique vers la zone lésée. Nous n'avons pas directement comparé l'injection intra-myocardique de CSMs au traitement par patch de CSMs. Cependant, il nous est apparu de façon assez flagrante chez le rat, que cette dernière méthode permettait d'obtenir des résultats plus probants que la méthode d'injection directe que nous avons utilisée initialement. D'ailleurs, certains travaux remettent eux-aussi en cause les possibilités d'amélioration de la fonction ventriculaire par l'injection seule de CSMs¹⁶⁵. Néanmoins, ces aspects purement méthodologiques ne suffisent pas à satisfaire

l'analyse de nos observations. Les interrogations qu'elles suscitent nous conduisent à élargir le champ des investigations nécessaires à la compréhension et à l'amélioration potentielle de nos propositions thérapeutiques. Présentement, nous limiterons volontairement nos commentaires à quelques points essentiels.

1 .Choix de la méthodologie concernant l'implantation du patch de CSM

A. Atteindre la zone cible

La distribution cellulaire, quelque soit la technique utilisée, constitue un élément méthodologique crucial, puisque l'efficacité thérapeutique est probablement fonction de la quantité de cellules transférées vers la zone d'action^{166, 167}, mais aussi fonction de la voie de délivrance. Par exemple, dans une étude menée par Forest sur un modèle porcin d'infarctus aigu¹⁶⁸, les auteurs démontrent que la perfusion cellulaire à partir d'une voie veineuse périphérique est bien insuffisante pour espérer concentrer le substrat thérapeutique au niveau cardiaque. Cette voie d'administration est donc *a fortiori* insuffisante au cours de la phase d'infarctus chronique puisque, d'une part, nous savons que la concentration tissulaire de facteurs chimioattractants est plus faible qu'en phase aiguë et, d'autre part, certains travaux ont démontré qu'en utilisant cette voie d'accès, l'essentiel des cellules perfusées se retrouvait dans le parenchyme pulmonaire¹⁶⁹. De plus, il nous semble assez peu logique d'espérer une migration cellulaire par voie circulatoire vers une zone élective que nous nous efforçons de définir comme significativement "hypoperfusée". Cette dernière observation va, elle aussi, à l'encontre de l'injection cellulaire par cathétérisme coronaire en situation de nécrose chronique, alors qu'en situation aiguë cette voie est précisément éminemment plus intéressante puisque par la même occasion, la désobstruction de l'artère coupable de l'infarctus aigu peut être entreprise.

Pour ce qui concerne les CSMs plus précisément, relativement peu atteignent leur cible ; Pasltis¹⁷⁰ indique que la plupart des cellules injectées en intra-coronaire s'agrègent et s'emprisonnent dans les petits capillaires et d'autres, au contraire, retournent à la circulation générale. Une limite à ces critiques réside cependant dans la possibilité d'atteindre le territoire cible justement par l'intermédiaire de la perfusion des territoires voisins, eux-mêmes perfusés et viables. Il s'agit alors d'entreprendre une *recolonisation cellulaire centripète* à l'opposée d'une

recolonisation cellulaire centrifuge qui s'organiserait à partir du centre lésionnel. Une deuxième limite à ces critiques vient de notre premier travail lui-même, puisqu'il montre assez clairement que l'efficacité néoangiogénique s'exerce surtout sur les zones voisines ou bordantes du centre traité, suggérant un effet paracrine. Il sous-entend, dès-lors, la possibilité, aussi, d'atteindre cette cible par le tissu voisin encore perfusé. Enfin, toujours concernant la méthode de délivrance, les perfusions cellulaires répétées ou itératives dans le temps pourraient, elles, avoir un impact qui n'a été, jusqu'à présent, que peu évalué¹⁷¹.

B. Augmenter l'efficience de la transplantation cellulaire

La transplantation directe des cellules au niveau intramyocardique, que ce soit par voie endomyocardique par cathétérisme endoventriculaire ou par voie épocardique (transpariétale), ne permet pas d'obtenir une délivrance optimale, en partie pour des raisons mécaniques aisément identifiables¹⁷²: (1) *la pression intratissulaire* dépendante de la densité tissulaire et la quantité de cellules délivrées par volume, (2) *l'effraction tissulaire* liée à l'aiguille, constituant elle-même un tunnel de sortie pour les cellules, et à l'élasticité du tissu à réparer, (3) *les contractions systoliques* augmentant les deux phénomènes précédemment évoqués. Dès les premières applications thérapeutiques, les pionniers de la technique chez l'homme attiraient notre attention sur cet aspect technique^{173, 174}. Un travail préalable de notre équipe a d'ailleurs pu quantifier la répartition par organe, à l'aide de l'injection de cellules marquées et repérées par tomoscintigraphie corporelle totale chez le petit animal. Il confirmait à son tour la fuite des cellules transplantées dans la zone cible et leur une séquestration au niveau pulmonaire mais aussi hépatique.

La méthodologie d'injection trans-épocardique directe est conditionnée en partie par le volume cellulaire à délivrer. Chez le rat, 1 ou 2 injections suffisaient à injecter 10^6 cellules dans un volume d'1 mL, alors que chez l'homme nous réalisons quasiment 20 injections en moyennes (dans 20 sites différents) pour injecter en moyenne 10^7 cellules dans 200 μ L de solution. Pour limiter les fuites lors de notre travail clinique, nous avons choisi de réaliser le geste à cœur arrêté sous clampage aortique. Ceci permettait d'identifier plus facilement la zone infarctée cible d'une part, et d'éviter une contraction systolique immédiate pouvant éjecter les cellules fraîchement transplantées d'autre part. Signalons que le problème de l'injection à cœur battant

a pu être partiellement résolu par un système de succion, stabilisateur de la zone cible¹⁷⁵ (elle-même repérée par méthode électrophysiologique). Notre expérience permet d'affiner maintenant la technique d'injection cellulaire qui doit (1) premièrement être à distance de la zone tissulaire cible et (2) deuxièmement qui doit être progressif en retirant l'aiguille afin de ne pas dilacérer les tissus et de répartir plus harmonieusement les cellules. Il nous semble néanmoins que cette méthode reste très approximative pour une véritable réhabilitation myocardique au sens de la reconstruction chirurgicale, mais probablement suffisante dans l'espoir de délivrer des facteurs moléculaires bénéfiques à la réparation myocardiques. Certains auteurs ont proposé des injections par "seringues multiples" pour homogénéiser la délivrance¹⁷⁶. Macroscopiquement, il faudrait alors ajuster le rayon de courbure de chaque seringue. Les aiguilles multiperforées, ne nous paraissent pas non plus être une solution idéale. Les colles biologiques limitant la fuite cellulaire restent aussi à évaluer.

A la lueur de ces observations, le choix de notre méthodologie lors de la mise au point de notre patch de CSMs, rejoint celui de Simpson, qui, à notre connaissance, fut le premier à publier une tentative de réparation de myocarde infarcté à l'aide d'un patch de collagène contenant des CSMs¹⁶³. Dans son travail, il soutient l'hypothèse que *la mise au point d'un patch cellulaire optimise la délivrance cellulaire au sein du tissu à traité* et, argumente-t-il, combien même le transfert cellulaire ne se ferait pas, la mise en contact direct du patch garantirait la distribution des facteurs paracrines sécrétés par les CSMs contenues dans le patch.

Notre approche, qui aboutit à un patch similaire à celui de Simpson, fut néanmoins le produit d'une volonté d'initier une réparation cardiaque par ingénierie tissulaire à l'instar des auteurs^{156, 157, 177} que nous avons déjà cités en fin de première partie, et non seulement un moyen de délivrer les cellules *in situ*. C'est pourquoi nous avons conçu ce patch tridimensionnelle à l'aide de collagène de type I. En plus de son utilisation aisée, rappelons une nouvelle fois qu'il est un des constituants principaux de la matrice extra-cellulaire myocardique^{178, 179}. Il procure une certaine résistance aux déformations cardiaques permanentes au cours d'un cycle. Par ailleurs, sa porosité et son organisation pourraient favoriser d'une part, une organisation cellulaire et d'autre part, les échanges cellulaires de chémokines et autres facteurs de croissance potentiellement impliqués dans la réparation tissulaire. Depuis l'initiation de notre expérience, de nombreux auteurs ont proposé divers constituants de matrices extra-cellulaires plus ou moins sophistiquées. Nous avons fait clairement le choix d'utiliser une *matrice facile d'utilisation, rapide à concevoir*, volontairement simple, pour écarter dans un premier temps la

problématique de la complexité de l'organisation du réseau de collagène. A vrai dire, nous n'avions que peu d'espoir de voir les CSMs s'auto-organisées en couches myofibrillaires comme certains auteurs l'ont suggéré. Notre objectif premier restait l'étude du potentiel thérapeutique des CSMs. Dans notre patch, quand nous mélangions les CSMs à la solution de collagène de type I, la distribution des cellules dans le réseau de collagène a été facilitée par l'homogénéité de la solution. Les propriétés physiques, en particulier la consistance du patch tridimensionnel mis au point, dépendait de la concentration initiale de CSMs incluses. Différents essais ont dû être menés pour obtenir un patch suffisamment consistant pour pouvoir être manipulé à la pince et surtout suturer à la surface du cœur du rat. Cette concentration correspondait à 1×10^6 cellules/150 μ L de collagène, ce qui reste relativement faible. D'autres auteurs avaient déjà démontré que les CSM présentaient la capacité de survivre dans une matrice 3-D de collagène pendant plus de 2 semaines, ce que nous avons aussi observé et venant ainsi conforter la validité de notre travail. Cependant, la mise en culture des cellules dans le gel de collagène a entraîné une modification de la morphologie des CSMs et aussi une modification de leur croissance. L'aspect sphéroïde des CSMs que nous avons observé était probablement lié aux modifications (réduction) des contacts inter-cellulaires dans un réseau de collagène à l'organisation inhomogène, et non à un début de mort cellulaire. De plus, comme nous l'avons présenté, ces cellules conservaient leur multi-potentialité propre à leur nature mésenchymateuse. En résumé, nous pensons que nos résultats sont en faveur d'une survie significative des CSMs transplantées, et comme Simpson¹⁶³ et d'autres¹⁸⁰, nous soutenons l'idée que le patch optimise la délivrance des cellules sur le site lésé.

C. Garantir la survie du transplant

La prévention de la fuite des cellules n'est qu'un des facteurs à améliorer. Le principal restant probablement la limitation des mécanismes de mort cellulaire faisant suite au traitement. *Le choix de cellules autologues assure l'absence de rejet immunitaire.* Nous n'avons pas non plus observé de rejet vis-à-vis du patch en collagène. De nombreuses études confirment aussi la possibilité de transplanter des cellules CSMs allogéniques compte-tenu de leur faible immunogénécité. Mais la survie du transplant est essentiellement conditionnée à la possibilité

des cellules de survivre dans un milieu a priori hostile hypoxique et pauvre en nutriments. Nous n'avons pas pu établir et quantifier le taux de survie en fonction du temps. Néanmoins, nous avons pu à chaque fois observer une réaction inflammatoire après transplantation directe des cellules mais aussi après greffe du patch. Nous avons noté que l'infiltration cellulaire aigue (polynucléaires) avait principalement lieu au niveau de l'effraction tissulaire en cas d'injection au niveau des 2 points de suture en cas de transplantation du patch de CSMs. L'observation à distance d'une amélioration de la perfusion tissulaire, notamment dans notre travail avec le patch de CSMs, laisse néanmoins présager de la survie à long terme du greffon ou tout du moins d'une efficacité satisfaisante des principes actifs. Concernant la résistance à l'hypoxie, nous avons déjà rappelé quelques données expérimentales et pré-cliniques démontrant l'adaptation particulière des CSMs, et surtout l'induction puissante que constitue l'hypoxie pour augmenter l'expression des facteurs de croissance angiogéniques.

2. Critiques concernant le suivi des CSM dans la réparation tissulaire

Comme nous l'avons déjà rappelé, la limite essentielle de nos études est liée à la difficulté de suivre « au pas » les cellules injectées et surtout la détection de leur devenir phénotypique. Les analyses histologiques par marquage immunocytochimique présentent l'avantage de faire l'inventaire, à un instant t, du contingent cellulaire dans la parcelle de tissu analysée¹⁸¹. Néanmoins, pour argumenter les mécanismes sous-jacents de la greffe cellulaire, l'étude de l'origine des cellules observées nous semble tout aussi cruciale. Ou alors, il nous faudrait sacrifier les animaux tout le long de l'expérience à intervalles réguliers... Au début de notre expérience, nous avons marqué les CSMs au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), mais la dilution de ce marquage le long des divisions cellulaires rendait la détection difficile. De même, nous avons essayé de marquer les CSM à la GFP (Green Fluorescent Protein) dont les images spectaculaires que nous avons initialement obtenues ont perdu de leur superbe lorsque nous avons pu constater par nous-mêmes, la capacité toute particulière du myocarde à produire de l'autofluorescence. D'autres l'ont aussi fait remarquer¹⁸², rendant les interprétations de nos coupes histologiques définitivement moins fiables. De plus, nous savons aussi maintenant, que

la phagocytose peut entraîner un marquage cellulaire des macrophages qui ingèrent en fait les débris des cellules fluorescentes¹⁸³. Nous avons également testé le marquage au BrdU. Il va de soi, que l'analyse histologique myocardique est particulièrement inadapté à l'évaluation clinique, bien qu'on puisse un jour imaginer des biopsies hyper-précises, grâce au développement d'une véritable cardioscopie intraventriculaire.

Cependant, le marquage des CSMs à l'oxine d'indium, effectué dans notre étude sur le patch, nous a permis de confirmer l'efficacité de cette technique concernant la délivrance des cellules juste au niveau de la zone cible. Nous pensons que la majorité des CSMs se sont retrouvées initialement là où nous voulions qu'elles soient...mais nous n'avons pas de preuves directes de leur survie intégrale. Malheureusement, la durée de vie de ce radio-marqueur ne nous permet cependant pas de suivre au jour le jour le devenir du greffon. C'est pourquoi, certains auteurs favorisent un marquage cellulaire par particules métalliques détectables en IRM : l'application des nanotechnologies dans le domaine du marquage cellulaire devient ainsi une nouvelle source d'espoir dans le suivi des cellules transplantées.

3. Hypothèses concernant la contribution du patch de CSM dans la réparation tissulaire cardiaque

Les données obtenues à partir de notre expérimentation ne permettent pas d'établir la réalité des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques observés. Les indices de contractilité ($dP/dt \text{ max}$) et de fonction diastolique ($dP/dt \text{ min}$) que nous avons employés restent très dépendant de la fréquence cardiaque et des conditions de charge, et ne peuvent donc pas être considérés comme des indices "purs" de la fonction cardiaque¹⁸⁴. Néanmoins, nos mesures recoupent un certain nombre d'observations déjà faites par d'autres, avec d'autres méthodes d'évaluation de la fonction ventriculaire, et de plus elles nous laissent la possibilité d'appréhender la problématique de la réparation tissulaire cardiaque sous différents angles.

Nombreuses sont les hypothèses qui pourraient, tout du moins en partie, expliquer nos résultats. Nous ne reviendrons que sur trois points qui nous semblent défendables à partir de nos observations, bien que nous n'en apportions pas pour le moment de preuves directes. (1)

Premièrement, *l'angiogénèse massive* que nous avons mise en évidence pourrait avoir eu un impact bénéfique au sein des zones bordantes de la nécrose tissulaire en particulier sur le tissu viable hibernant. (2) Deuxièmement, nous pensons que les *modifications physiques et morphologiques de la paroi ventriculaire* traitée avec le patch de CSMs pourraient aussi expliquer l'amélioration globale constatée de la fonction ventriculaire gauche. (3) Enfin, *la conjonction des deux phénomènes précédents, pourrait à son tour favoriser et renforcer les conditions microcirculatoires locales*. Nous commentons ici de manière synthétique ces quelques points d'explication trop rapidement évoqués dans la discussion de l'article 3 (Partie 2).

A. Effet des CSM sur l'angiogénèse

L'angiogénèse fait communément référence à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants (contrairement à la vasculogénèse qui, elle, fait référence à la formation de vaisseaux à partir de précurseurs). Bien que la densité capillaire de la zone que nous définissons comme nécrotique ne soit pas nulle, la perfusion y est particulièrement réduite. La question de la primauté du flux sanguin ou du vaisseau, ne semble cependant pas éliminer cette hypothèse. En effet, il y a déjà plus d'une trentaine d'années, Folkmann¹⁸⁵ observait que des cellules endothéliales pouvaient former *un tube (ou néo-vaisseau) sans qu'il y ait de flux sanguin à l'intérieur*.

Néanmoins, il nous semble admis que l'importance du débit sanguin constitue un facteur de l'organisation des vaisseaux et d'ailleurs certains auteurs ont démontré que la perturbation des flux entraînent *per se* un dysfonctionnement endothélial¹⁸⁶. L'angiogénèse est aussi fortement contrôlée par des signaux induits suite à l'hypoxémie, et est fortement stimulée par une PO₂ tissulaire locale basse^{187, 188}. *L'interaction flux sanguin/gradient des facteurs locaux* semble influencer la formation micro-vasculaire comme cela a été montrée par le rôle du gradient de VEGF interstitiel dans l'organisation capillaire et du circuit lymphatique¹⁸⁹.

En fait, le flux liquidien adopte une double influence, d'une part par son rôle de transporteur de facteurs de croissance, et d'autre part par son action mécanique directe¹⁹⁰. Ce rôle mécanique a d'ailleurs été mis en évidence sur des précurseurs mésenchymateux in vitro qui formaient des microtubes au contact du flux liquidien¹⁹¹. L'angiogénèse est aussi sous la

régulation de protéines contractiles, telles l'actine du cytosquelette et la myosine non musculaire, présentes dans toutes les cellules puisqu'elles ont toutes un cytosquelette¹⁹². La double interaction flux/gradients de facteurs de croissance étant nécessaire, il est envisageable que la suture chirurgicale initiale du patch ait entraîné une part d'angiogénèse liée à l'inflammation aiguë post-traumatique qui s'est poursuivie dans le temps grâce à l'action paracrine des CSMs qui a déjà été discutée préalablement dans ce travail (entraînant soit un recrutement de précurseurs endothéliaux, soit une différenciation endothéliale comme le suggèrent d'autres auteurs).

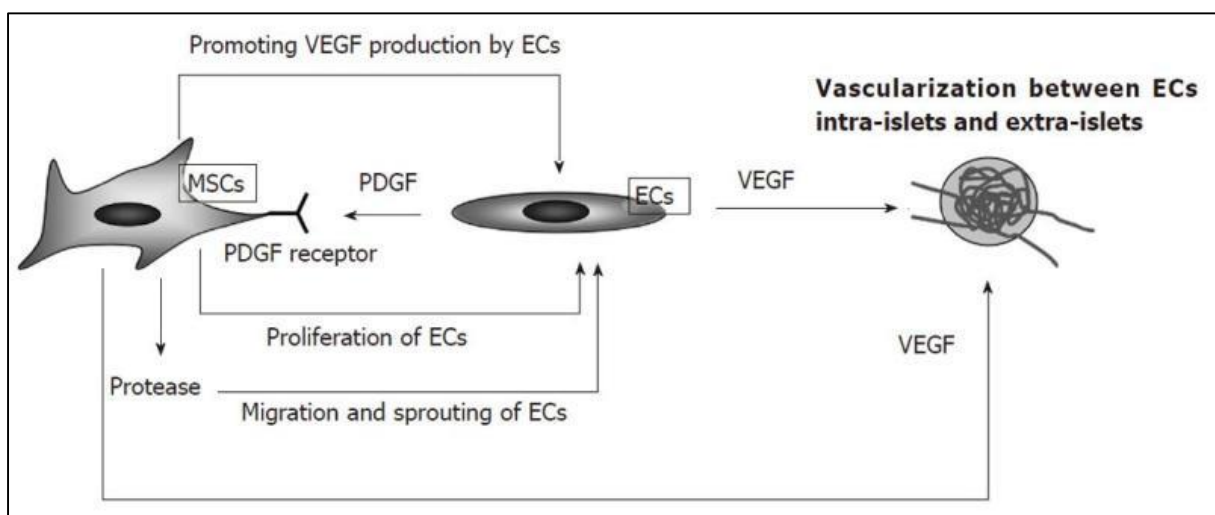


Figure 18 : Action des CSMs sur l'angiogénèse.

B. Effet sur le remodelage inverse: de la microstructure à l'anatomie fonctionnelle.

Comme d'autres, nous avons constaté que notre patch cellulaire permettait d'augmenter l'épaisseur ventriculaire pariétale tout en réduisant les volumes ventriculaires. Ces paramètres étaient par ailleurs liés à une amélioration des performances fonctionnelles systoliques et diastoliques. Nous ne réinsisterons pas sur la possibilité du recrutement de cardiomyocytes "hibernant" en bordure de la lésion nécrotique, grâce au mécanisme angiogénique induit par les CSMs. Rappelons que nos observations histologiques ont révélé une réorganisation de la zone

infarcie par des fibromyoblastes. *Cependant, nous n'avons observé aucun "néo-cardiomyocyte"* (ni dans les expériences d'injection directe d'ailleurs). Pourtant, selon certains, l'induction mécanique pourrait, sous certaines conditions, favoriser la différenciation cardiomyocytaire des CSMs. Comprendre la place qu'occupent les contraintes mécaniques dans la cardiogénèse n'est néanmoins pas une tâche aisée. Pour ce qui concerne les CSMs, la place de l'induction mécanique semble tout de même majeure dans leur différenciation : McBeath et al ont démontré que des CSMs isolées changeaient leur voie de différenciation en fonction de la surface de contact qui leur était attribuée¹⁹³ et Engler et al¹⁹⁴ ont démontré que les CSMs adoptaient un phénotype différent en fonction de la densité de la matrice extra-cellulaire où elles étaient cultivées. De plus, *in vivo*, la différenciation des myoblastes en myotubes requièrent un équilibre entre les influences du gène codant pour RhoA (Ras homolog gene family, member A) et de la myosine¹⁹⁰. Ces observations, et bien d'autres, justifient les essais des mécano-inductions pré-thérapeutiques, que nous avons nous mêmes tentées, dans le but d'influencer l'organisation cellulaire. Pourtant, la mécano-induction *in situ* ne semble pas provoquer les mêmes effets.

Cette stratégie n'a donc pas augmenté le nombre absolu d'unités sarcomériques. Néanmoins, comme d'autres¹⁹⁵, nous pensons que le patch peut favoriser l'amélioration des performances ventriculaires en modifiant la structure même du myocarde ainsi que les propriétés viscoélastiques de la paroi malade. Bien que nous n'ayons pas approfondi cette approche mécanistique purement physique, nous pouvons brièvement suggérer les modifications bénéfiques que le patch a pu entraîner:

- *Rôle de tissu de soutien favorisant* : (1) la prévention de la dilatation ventriculaire par réalisation d'un pont solidaire entre deux zones d'ancrage du patch, (2) la prévention du remodelage ventriculaire en ventricule sphérique en limitant cette fois-ci la diminution du rayon de courbure ventriculaire et (3) en prévenant la réorientation cardiomyocytaire grâce à une réorganisation fibromyocytaire favorisant le maintien des axes fibrillaires.

- *Amélioration des propriétés mécaniques du myocarde passif* : (1) facilitation du raccourcissement fibrillaire (amélioration de la fonction systolique) et (2) facilitation du remplissage ventriculaire par facilitation de la relaxation ventriculaire.

Dans notre travail, le bénéfice fonctionnel reste néanmoins assez modeste et d'une manière générale, l'ensemble des expériences de cardiomyoplastie cellulaire reste encore éloignées

d'une reconstruction architecturale à l'identique, qui pourrait réellement "normaliser" la fonction du cœur lésé.

C. Bénéfice sur le fonctionnement micro-circulatoire

Nos études ont toutes montré un bénéfice sur la perfusion tissulaire. En plus de celles soutenues précédemment, nous émettons aussi l'hypothèse que les modifications pariétales induites par la mise en place du patch de CSMs en augmentant les échanges au sein du tissu infarcté, réduit la densité intratissulaire et augmente la capacitance interstitielle au niveau du tissu pathologique (par l'effet angiogénique *per se*). Simultanément, le patch, en renforçant la paroi ventriculaire, améliorerait les propriétés élastiques ventriculaires détériorées au sein du tissu fibreux. En nous basant sur le modèle micro-circulatoire myocardique de Bruinsma¹⁹⁶, il devient licite d'envisager que l'ensemble de ces modifications favoriserait donc aussi la mécanique micro-circulatoire myocardique.

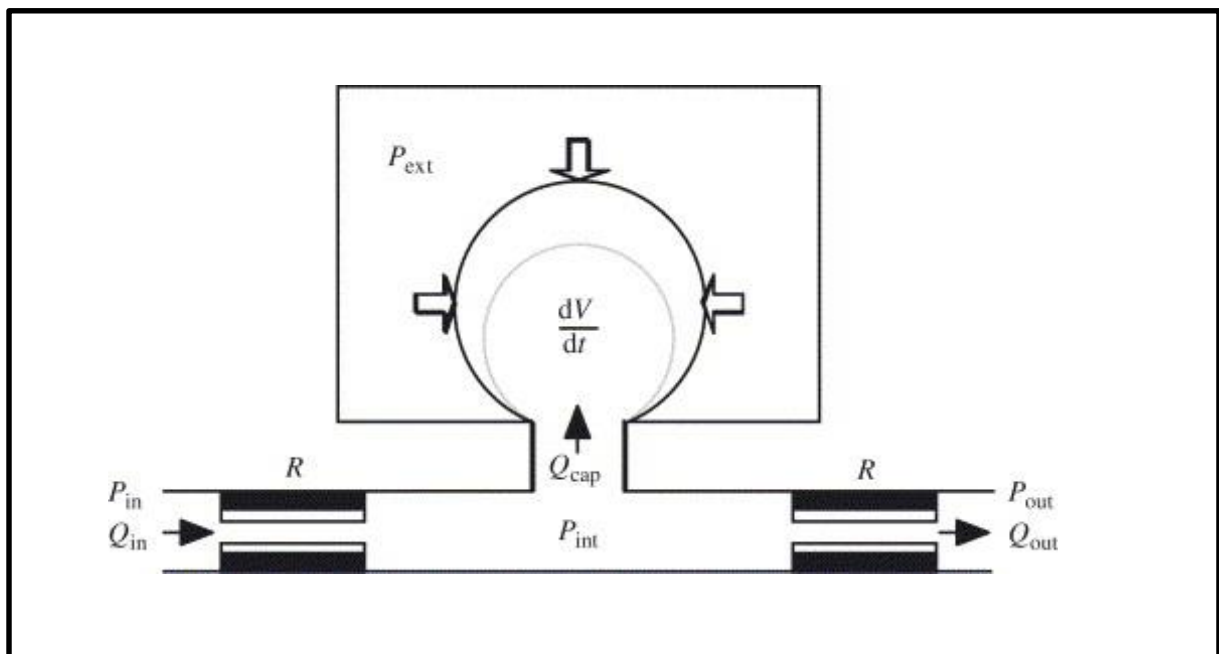


Figure 19 : Représentation schématique d'une unité microcirculatoire. L'angiogénèse pourrait augmenter le nombre de ces unités. Par ailleurs, le rapport dV/dt pourrait s'accroître par (1) l'augmentation de P_{ext} en phase de systole et (2) par la réduction de P_{ext} en phase diastolique par modification des propriétés élastiques du milieu extra-vasculaire.

II. PERSPECTIVES A COURT TERME

Nous avons suffisamment explicité les principales limites de notre travail. Fondamentalement, d'un point de vue théorique, il nous semble que l'écueil principal de ce type de travaux réside en la difficulté de relier les observations biologiques avec les explications mécanistiques du fonctionnement myocardique. En d'autres termes, il nous semble que la modélisation mathématique de la fonction "pompe cardiaque" à l'échelle cellulaire, peut nous aider à interpréter les résultats obtenus par nos tentatives thérapeutiques. Ainsi, les processus biochimiques bénéfiques induits à l'étage cellulaire pourront être intégrés à une dimension mécanistique micro et macroscopique.

D'un point de vue méthodologique, les essais sur le gros animal (chez le porc en particulier) devraient faciliter la résolution des difficultés techniques liées à l'implantation ou au choix du nombre de cellules à utiliser. Mais c'est probablement l'application des nanotechnologies¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ qui pourra conduire à franchir de nouvelles étapes, non seulement dans l'imagerie et la détection tissulaire de l'agent thérapeutique, mais surtout dans la création de matrices extra-cellulaires construites "sur mesure", permettant, par exemple, l'organisation fibrillaire des cellules ou bien la mise au point de véritables micro-canaux permettant la délivrance d'un ou plusieurs facteurs de croissance à l'endroit voulu...

Le choix du type cellulaire est encore souvent considéré comme le facteur essentiel de la tentative de reconstruction cardiaque. Cependant, le travail avec les CSMs ne doit persévérer qu'à la condition que suffisamment d'études accumulent les preuves concernant leur utilité. Actuellement, le pré-conditionnement cellulaire (mécanique et métabolique), les possibilités de reprogrammation d'autres types cellulaires, ainsi que la mise au point de tissus dont l'organisation peut être contrôlée ex vivo constituent probablement des voies pouvant être investiguées rapidement et ne devant pas nous enfermer dans l'utilisation d'un seul type cellulaire.

Commentaires sur les bioprothèses pour contention ventriculaire et régénération myocardique en développement, Etude Européen Recatabi, <http://www.recatabi.com/>

Reference: [Development of cardiac support bioprotheses for ventricular restoration and myocardial regeneration](#). Shafy A, Fink T, Zachar V, Lila N, Carpentier A, Chachques JC. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Aug 31. [Epub ahead of print]

L'application clinique constitue un objectif et même une finalité dans une certaine mesure. Mais la course que se livrent les chercheurs et les cliniciens du monde entier, bénéfique sous bien des aspects, constitue parfois un véritable frein lié aux divergences de point de vue et parfois à de véritables croyances plus ou moins prononcées en faveur d'une stratégie plutôt qu'une autre, empêchant des essais à petite ou grande échelle comme il en existe pourtant tellement dans le domaine pharmacologique de la cardiopathie ischémique et de l'insuffisance cardiaque en général. Nous n'aborderons pas, volontairement, le problème des conflits d'intérêts qui découlera probablement de la maîtrise de l'exploitation d'un procédé tissulaire particulier, à l'instar des enjeux économiques qui se mêlent inévitablement à la recherche pharmacologiques.

III. THERAPIE CELLULAIRE VERSUS COEUR ARTIFICIEL MECANIQUE: BIO-IMITATION OU CYBER-MEDECINE?

Au sein de chaque organisme, plusieurs centaines de millions de cellules se rangent, s'ordonnent et vieillissent selon des séquences précises et continues qui se répètent en chacun de nous et qui se modifient imperceptiblement génération après génération : l'organogénèse et la phylogénèse constituent de ce point de vue les modèles originaux de l'ingénierie cardiaque. Pendant toute une vie, le myocarde éjecte quotidiennement les quelques milliers de litres de sang nécessaires au bon fonctionnement humain au prix d'une intense activité métabolique aérobie et cela presque sans effort et sans souffrance ressentie. Les cardiopathies, quels que soient leurs mécanismes d'initiation, peuvent toutes aboutir à l'inadéquation complète de la pompe cardiaque. Plus particulièrement, dans le cadre de la cardiopathie ischémique chronique, la thérapie cellulaire et/ou l'ingénierie tissulaire cardiaque repose, nous l'avons déjà exprimé différemment, essentiellement sur deux paradigmes et une hypothèse. Le premier concernait

l'incapacité « naturelle » de notre cœur à reconstituer un tissu myocardique à l'identique après un infarctus. Le deuxième, moins puissant, reposait sur l'assertion qu'il est possible de contrôler, dans une certaine mesure, le devenir phénotypique cellulaire. A partir de là, l'hypothèse de travail que l'on peut étendre à toute la médecine dite régénérative faisait surface : *puisque la cicatrisation naturelle nous semble insuffisante, nous émettons alors l'hypothèse que l'utilisation d'un ou plusieurs groupes cellulaires pourraient, sous des conditions particulières, participer à la réorganisation fonctionnelle d'un tissu endommagé.* Cette approche globale présente l'avantage de faire prendre conscience que les pistes de recherches sont très nombreuses et recouvrent un vaste champ de la biologie : de la reprogrammation génétique à la chirurgie expérimentale, de l'étude de l'embryogénèse à celle du rôle des différents types de mort cellulaire, pour ne citer que quelques exemples. *Le point commun de tous ces domaines d'investigation est la volonté de mieux comprendre la biologie cardiaque pour mieux l'imiter ou mieux la dépasser...*

Pourtant, comme nous l'avons rapporté, les résultats cliniques patents démontrant l'amélioration de la fonction "pompe" restent décevants comparativement aux résultats que laissent suggérer les travaux expérimentaux chez l'animal (dont les nôtres participent...). Dans d'autres domaines où la performance mécanique reste l'objectif, la bio-imitation n'a pas suffi pour atteindre le but final. L'aéronautique en est l'exemple flagrant: le fonctionnement de la majorité de nos avions, fusées et autres engins volant actuels est fondamentalement bien éloigné de celui des oiseaux ou des insectes. Depuis quelques années d'ailleurs, force est de constater que les progrès en terme d'assistance cardio-vasculaire sont quasiment exclusivement venus de la miniaturisation de pompes de fonctionnement exclusivement mécanique (pompes pneumatiques et surtout pompes centrifuges actuellement). L'étude REMATCH²⁰⁰ en est une belle illustration, démontrant même que l'assistance mécanique pouvait, dans certaines circonstances, faire aussi bien que la transplantation cardiaque. Les progrès de l'hémocompatibilité ainsi que les technologies qui permettront la transmission d'énergie par voie transcutanée, accentueront prochainement l'avance de la voie cybernétique.

Commentaires sur l'article :

Kirsch M, Mazzucotelli JP, Roussel JC, Bouchot O, N'loga J, Leprince P, Litzler PY, Vincentelli A; Groupe de Réflexion sur l'Assistance Mécanique. Survival after biventricular mechanical circulatory support: does the type of device matter? J Heart Lung Transplant. 2012;31:501-8.

Patients undergoing prolonged support (>90 days) tended to have improved survival when supported with TAH compared with BiVADs, which may be related to a lower incidence of neurologic events.

Aussi, il n'est pas impossible que le cœur artificiel de demain, n'est besoin d'aucune cellule ou matrice extra-cellulaire, et que toutes les recherches actuelles concernant la thérapie cellulaire cardiaque restent veines, du point de vue exclusivement clinique, bien entendu.

Commentaires sur le cœur bio-artificiel français CARMAT (CARpentier-MATra):

<http://www.carmatsa.com/>

Le scénario, mettant la médecine régénératrice au premier plan de la thérapeutique, n'est donc pas certain. Mais déjà, nous pouvons entrevoir quelques collaborations prometteuses entre l'assistance mécanique et la bio-assistance rendant nos efforts utiles, dans l'une comme dans l'autre de ces approches.

IV. CONCLUSION

Notre parcours expérimental nous a conduit à réaliser la greffe chirurgicale épicaudique d'un patch en collagène conçu à l'aide de CSMs autologues chez le rat. Cette application était liée à un effet bénéfique dans le traitement de l'infarctus chronique du myocarde. Le patch de CSMs permettait un remodelage inverse du ventricule gauche probablement obtenu par un renforcement direct de l'architecture pariétale du ventricule lésé, mais aussi par des mécanismes paracrines induisant en particulier une néo-angiogénèse significative ; il en résultait une amélioration significative des performances myocardiques fonctionnelles comparativement aux animaux non traités.

Bien que d'un point de vue fondamental, notamment à l'échelle cellulaire et infra-cellulaire, la compréhension des mécanismes impliqués dans nos observations restent largement insuffisante, il nous semble que ces résultats sont suffisamment encourageants tout de même pour nous permettre d'insister dans l'élaboration *in vivo* et/ou *in vitro* de néo-tissus destinés à induire la réparation et même à remplacer le tissu défaillant.

Finalement, à l'heure où la médecine régénératrice génère plus de questionnements chez les chercheurs et les praticiens que de cardiomyocytes chez nos malades, je prends le risque de penser que l'ambition de réparer un tissu lésé *ad integrum*, si elle n'est pas la plus efficace de nos voies thérapeutiques actuelles, constitue, au moins, une des voies probablement les plus enrichissantes dans l'approfondissement de la connaissance du fonctionnement myocardique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nature reviews. Cardiology*. 2011;8:30-41
2. Eriksson H. Heart failure: A growing public health problem. *Journal of internal medicine*. 1995;237:135-141
3. McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*. 2000;83:596-602
4. Nabel EG, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2012;366:54-63
5. Krumholz HM, Wang Y, Chen J, Drye EE, Spertus JA, Ross JS, Curtis JP, Nallamothu BK, Lichtman JH, Havranek EP, Masoudi FA, Radford MJ, Han LF, Rapp MT, Straube BM, Normand SL. Reduction in acute myocardial infarction mortality in the united states: Risk-standardized mortality rates from 1995-2006. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;302:767-773
6. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994;264:98-101
7. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;938:221-229; discussion 229-230
8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705
9. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:10344-10349
10. Tran N, Bertrand S, Li Y, Carteaux JP, Stoltz JF, Villemot JP. Beneficial hemodynamic effects of autologous bone marrow cell transplantation in rats with heart failure. *Transplantation proceedings*. 2002;34:3262-3264
11. Tran N, Li Y, Bertrand S, Bangratz S, Carteaux JP, Stoltz JF, Villemot JP. Autologous cell transplantation and cardiac tissue engineering: Potential applications in heart failure. *Biorheology*. 2003;40:411-415
12. Tran N, Marie PY, Nloga J, Mascali F, Franken P, Lahoutte T, Li Y, Antunes L, El Jaafari A, Bensoussan D, Stoltz JF, Villemot JP. Autologous cell based therapy for treating chronic infarct myocardium. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2005;33:263-268
13. Maureira P, Tran N, Djaballah W, Angioi M, Bensoussan D, Didot N, Fay R, Sadoul N, Villemot JP, Marie PY. Residual viability is a predictor of the perfusion enhancement obtained with the cell therapy of chronic myocardial infarction: A pilot multimodal imaging study. *Clinical nuclear medicine*. 2012;37:738-742
14. Braunwald E. Control of myocardial oxygen consumption: Physiologic and clinical considerations. *The American journal of cardiology*. 1971;27:416-432
15. Sanders M, Kostis JB. Anatomy versus physiology in the prognosis of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 1987;10:1365-1366
16. Schelbert HR. Anatomy and physiology of coronary blood flow. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*. 2010;17:545-554

17. Komaru T, Kanatsuka H, Shirato K. Coronary microcirculation: Physiology and pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*. 2000;86:217-261
18. Chilian WM, Marcus ML. Phasic coronary blood flow velocity in intramural and epicardial coronary arteries. *Circulation research*. 1982;50:775-781
19. Marcus ML, Chilian WM, Kanatsuka H, Dellsperger KC, Eastham CL, Lamping KG. Understanding the coronary circulation through studies at the microvascular level. *Circulation*. 1990;82:1-7
20. Kajiya F, Goto M. Integrative physiology of coronary microcirculation. *The Japanese journal of physiology*. 1999;49:229-241
21. Swan HJ. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction in the acute phases of myocardial ischaemia and infarction, and in the later phases of recovery. Function follows morphology. *European heart journal*. 1993;14 Suppl A:48-56
22. Moller JE, Egstrup K, Kober L, Poulsen SH, Nyvad O, Torp-Pedersen C. Prognostic importance of systolic and diastolic function after acute myocardial infarction. *American heart journal*. 2003;145:147-153
23. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiological reviews*. 2008;88:1009-1086
24. Cademartiri F, Runza G, Luccichenti G, Galia M, Mollet NR, Alaimo V, Brambilla V, Gualerzi M, Coruzzi P, Midiri M, Lagalla R. Coronary artery anomalies: Incidence, pathophysiology, clinical relevance and role of diagnostic imaging. *La Radiologia medica*. 2006;111:376-391
25. Lim MJ, Kern MJ. Coronary pathophysiology in the cardiac catheterization laboratory. *Current problems in cardiology*. 2006;31:493-550
26. Redwood SR, Ferrari R, Marber MS. Myocardial hibernation and stunning: From physiological principles to clinical practice. *Heart*. 1998;80:218-222
27. Camici PG, Prasad SK, Rimoldi OE. Stunning, hibernation, and assessment of myocardial viability. *Circulation*. 2008;117:103-114
28. Heusch G, Schulz R. The biology of myocardial hibernation. *Trends in cardiovascular medicine*. 2000;10:108-114
29. Bolli R, Zhu WX, Thornby JJ, O'Neill PG, Roberts R. Time course and determinants of recovery of function after reversible ischemia in conscious dogs. *The American journal of physiology*. 1988;254:H102-114
30. Tran N, Franken PR, Maskali F, Nloga J, Maureira P, Poussier S, Groubatch F, Vanhove C, Villemot JP, Marie PY. Intramyocardial implantation of bone marrow-derived stem cells enhances perfusion in chronic myocardial infarction: Dependency on initial perfusion depth and follow-up assessed by gated pinhole spect. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2007;48:405-412
31. Sciagra R, Bisi G, Santoro GM, Zeraushek F, Sestini S, Pedenovi P, Pappagallo R, Fazzini PF. Comparison of baseline-nitrate technetium-99m sestamibi with rest-redistribution thallium-201 tomography in detecting viable hibernating myocardium and predicting postrevascularization recovery. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30:384-391
32. Ghosh N, Rimoldi OE, Beanlands RS, Camici PG. Assessment of myocardial ischaemia and viability: Role of positron emission tomography. *European heart journal*. 2010;31:2984-2995
33. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research*. 2012;110:159-173
34. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFftRoMI. Universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50:2173-2195
35. Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2001;280:H2726-2731

36. Erlebacher JA. Ventricular remodeling in myocardial infarction--the rat and the human. *The American journal of cardiology*. 1985;56:910
37. Erlebacher JA, Richter RC, Alonso DR, Devereux RB, Gay WA, Jr. Early infarct expansion: Structural or functional? *Journal of the American College of Cardiology*. 1985;6:839-844
38. Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circulation research*. 1991;68:856-869
39. Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibacache M, Criollo A, Nemchenko A, Hill JA, Lavandero S. Cardiomyocyte death: Mechanisms and translational implications. *Cell death & disease*. 2011;2:e244
40. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: Mechanisms and significance. *Annual review of physiology*. 2010;72:19-44
41. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100:1363-1372
42. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Experimental cell research*. 1996;226:316-327
43. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94:1621-1628
44. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *The American journal of pathology*. 1995;146:1325-1331
45. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132:27-42
46. Marambaio P, Toro B, Sanhueza C, Troncoso R, Parra V, Verdejo H, Garcia L, Quiroga C, Munafo D, Diaz-Elizondo J, Bravo R, Gonzalez MJ, Diaz-Araya G, Pedrozo Z, Chiong M, Colombo MI, Lavandero S. Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1802:509-518
47. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Weiss CS, Bea F, Bekerredjian R, Schinke-Braun M, Izumo S, Katus HA, Hardt SE. Beneficial effects of mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54:2435-2446
48. van den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nature reviews. Cardiology*. 2010;7:30-37
49. Chilian WM, Kuo L, DeFily DV, Jones CJ, Davis MJ. Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and pathophysiological conditions. *European heart journal*. 1993;14 Suppl I:55-59
50. Knaapen P, Camici PG, Marques KM, Nijveldt R, Bax JJ, Westerhof N, Gotte MJ, Jerosch-Herold M, Schelbert HR, Lammertsma AA, van Rossum AC. Coronary microvascular resistance: Methods for its quantification in humans. *Basic research in cardiology*. 2009;104:485-498
51. Haitsma DB, Bac D, Raja N, Boomsma F, Verdouw PD, Duncker DJ. Minimal impairment of myocardial blood flow responses to exercise in the remodeled left ventricle early after myocardial infarction, despite significant hemodynamic and neurohumoral alterations. *Cardiovascular research*. 2001;52:417-428
52. Ali MH, Schumacker PT. Endothelial responses to mechanical stress: Where is the mechanosensor? *Critical care medicine*. 2002;30:S198-206

53. Jaggar JH, Wellman GC, Heppner TJ, Porter VA, Perez GJ, Gollasch M, Kleppisch T, Rubart M, Stevenson AS, Lederer WJ, Knot HJ, Bonev AD, Nelson MT. Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca²⁺-activated K⁺ channels: A functional unit for regulating arterial tone. *Acta physiologica Scandinavica*. 1998;164:577-587
54. Hoffman JI, Spaan JA. Pressure-flow relations in coronary circulation. *Physiological reviews*. 1990;70:331-390
55. Westerhof N, Boer C, Lamberts RR, Sipkema P. Cross-talk between cardiac muscle and coronary vasculature. *Physiological reviews*. 2006;86:1263-1308
56. Emond M, Mock MB, Davis KB, Fisher LD, Holmes DR, Jr., Chaitman BR, Kaiser GC, Alderman E, Killip T, 3rd. Long-term survival of medically treated patients in the coronary artery surgery study (cass) registry. *Circulation*. 1994;90:2645-2657
57. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230-247
58. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*. 1987;20:263-272
59. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147
60. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103:697-705
61. Hattori N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovascular research*. 2005;65:334-344
62. Hattori F, Fukuda K. Strategies for ensuring that regenerative cardiomyocytes function properly and in cooperation with the host myocardium. *Experimental & molecular medicine*. 2010;42:155-165
63. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2007;6:593-597
64. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental biology and medicine*. 2004;229:623-631
65. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *The Annals of thoracic surgery*. 2003;75:775-779
66. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340:639-647
67. Kiefer JC. Epigenetics in development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236:1144-1156
68. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-776
69. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal Isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005;433:647-653

70. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *International journal of cardiology*. 2006;109:74-81
71. Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri SH, Piryaee A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell biology international*. 2008;32:1183-1192
72. Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324:481-488
73. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature medicine*. 2005;11:367-368
74. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2008;26:2287-2299
75. Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, Hagino I, Mori H, Sawa Y, Yagihara T, Kitamura S, Nagaya N. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;374:11-16
76. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS. Sdf-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21:3197-3207
77. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, O'Brien T, Samali A, Barry F, Szegedzi E. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem cells*. 2008;26:1325-1336
78. Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2006;24:416-425
79. Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, Wei L. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;135:799-808
80. Wang JA, He A, Hu X, Jiang Y, Sun Y, Jiang J, Gui C, Wang Y, Chen H. Anoxic preconditioning: A way to enhance the cardioprotection of mesenchymal stem cells. *International journal of cardiology*. 2009;133:410-412
81. Etzion S, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Myocardial regeneration: Present and future trends. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. 2001;1:233-244
82. Mancini D, Lietz K. Selection of cardiac transplantation candidates in 2010. *Circulation*. 2010;122:173-183
83. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circulation research*. 2002;90:634-640
84. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *The New England journal of medicine*. 2002;346:5-15
85. Sedmera D, McQuinn T. Embryogenesis of the heart muscle. *Heart failure clinics*. 2008;4:235-245
86. Herdrich BJ, Danzer E, Davey MG, Allukian M, Englefield V, Gorman JH, 3rd, Gorman RC, Liechty KW. Regenerative healing following foetal myocardial infarction. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2010;38:691-698

87. Chen JN, Fishman MC. Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development*. 1996;122:3809-3816
88. Tonissen KF, Drysdale TA, Lints TJ, Harvey RP, Krieg PA. Xnkn-2.5, a xenopus gene related to nkx-2.5 and tinman: Evidence for a conserved role in cardiac development. *Developmental biology*. 1994;162:325-328
89. Zhang H, Toyofuku T, Kamei J, Hori M. Gata-4 regulates cardiac morphogenesis through transactivation of the n-cadherin gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312:1033-1038
90. Lilly B, Zhao B, Ranganayakulu G, Paterson BM, Schulz RA, Olson EN. Requirement of mads domain transcription factor d-mef2 for muscle formation in drosophila. *Science*. 1995;267:688-693
91. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS letters*. 2002;530:239-243
92. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ. Persistent expression of the atp-binding cassette transporter, abcg2, identifies cardiac sp cells in the developing and adult heart. *Developmental biology*. 2004;265:262-275
93. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:14068-14073
94. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:12313-12318
95. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324:98-102
96. Wessels A, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (epdcs) as cardiac stem cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;276:43-57
97. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Adult stem cells and their cardiac potential. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;276:103-112
98. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation research*. 2004;95:911-921
99. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779
100. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin t in acute coronary syndromes: A timi 11a substudy. Thrombolysis in myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31:1460-1465
101. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*. 1999;85:221-228
102. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: From adaptation to maladaptation. *Annual review of physiology*. 2003;65:81-101

103. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovascular research*. 2002;55:329-340
104. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999;99:1492-1498
105. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circulation research*. 1997;81:187-195
106. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:2700-2705
107. Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, Ratajska A, Dembinska-Kiec A. The time course of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression in an experimental model of chronic myocardial infarction in rats. *Journal of vascular research*. 2001;38:288-300
108. Heba G, Krzeminski T, Porc M, Grzyb J, Dembinska-Kiec A. Relation between expression of tn timer alpha, inos, vegf mrna and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2001;52:39-52
109. Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, Hasegawa H, Zou Y, Qin Y, Odaka K, Hiroshima K, Tadokoro H, Komuro I. Effects of g-csf on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;325:1353-1359
110. Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, Fiaccavento R, Carotenuto F, De Vito P, Baldini PM, Prat M, Di Nardo P. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: Proliferation, migration, and differentiation. *Stem cells*. 2006;24:23-33
111. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703
112. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;102:3060-3067
113. Panas D, Khadour FH, Szabo C, Schulz R. Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. *The American journal of physiology*. 1998;275:H1016-1023
114. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:6753-6757
115. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular research*. 2000;46:214-224
116. Tentolouris C, Tousoulis D, Antoniades C, Bosinakou E, Kotsopoulou M, Trikas A, Toutouzas P, Stefanadis C. Endothelial function and proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *International journal of cardiology*. 2004;94:301-305
117. Munoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: Engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24:4585-4595
118. Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem cells*. 2004;22:415-427
 119. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108:863-868
 120. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, Penn MS. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem cells*. 2007;25:245-251
 121. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of cell biology*. 2003;160:909-918
 122. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15:1794-1804
 123. Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine msc show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 2003;17:160-170
 124. Chang SA, Lee EJ, Kang HJ, Zhang SY, Kim JH, Li L, Youn SW, Lee CS, Kim KH, Won JY, Sohn JW, Park KW, Cho HJ, Yang SE, Oh WI, Yang YS, Ho WK, Park YB, Kim HS. Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: Effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation. *Stem cells*. 2008;26:1901-1912
 125. Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Cohen IS. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *The Journal of physiology*. 2004;555:617-626
 126. Paul D, Samuel SM, Maulik N. Mesenchymal stem cell: Present challenges and prospective cellular cardiomyoplasty approaches for myocardial regeneration. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11:1841-1855
 127. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: Mesenchymal stromal cells: Potential for cardiovascular repair. *Stem cells*. 2008;26:2201-2210
 128. Tang JM, Wang JN, Zhang L, Zheng F, Yang JY, Kong X, Guo LY, Chen L, Huang YZ, Wan Y, Chen SY. Vegf/sdf-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovascular research*. 2011;91:402-411
 129. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (magic) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008;117:1189-1200
 130. Rufaihah AJ, Haider HK, Heng BC, Ye L, Tan RS, Toh WS, Tian XF, Sim EK, Cao T. Therapeutic angiogenesis by transplantation of human embryonic stem cell-derived cd133+ endothelial progenitor cells for cardiac repair. *Regenerative medicine*. 2010;5:231-244
 131. Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Tillmanns H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Tonn T, Dimmeler S, Dill T, Zeiher AM, Schachinger V, Investigators R-A. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circulation. Heart failure*. 2010;3:89-96

132. Kong CW, Akar FG, Li RA. Translational potential of human embryonic and induced pluripotent stem cells for myocardial repair: Insights from experimental models. *Thrombosis and haemostasis*. 2010;104:30-38
133. van der Bogt KE, Sheikh AY, Schrepfer S, Hoyt G, Cao F, Ransohoff KJ, Swijnenburg RJ, Pearl J, Lee A, Fischbein M, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. *Circulation*. 2008;118:S121-129
134. Gneccchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascular pharmacology*. 2012;57:48-55
135. Chachques JC, Grandjean P, Schwartz K, Mihaileanu S, Fardeau M, Swynghedauw B, Fontaliran F, Romero N, Wisnewsky C, Perier P, et al. Effect of latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty on ventricular function. *Circulation*. 1988;78:III203-216
136. Chachques JC, Grandjean PA, Carpentier A. Latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty. *The Annals of thoracic surgery*. 1989;47:600-604
137. Chachques JC, Trainini JC, Lago N, Cortes-Morichetti M, Schussler O, Carpentier A. Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (magnum trial): Clinical feasibility study. *The Annals of thoracic surgery*. 2008;85:901-908
138. Mukaddirov M, Demaria RG, Perrault LP, Frapier JM, Albat B. Reconstructive surgery of postinfarction left ventricular aneurysms: Techniques and unsolved problems. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2008;34:256-261
139. Westaby S. Non-transplant surgery for heart failure. *Heart*. 2000;83:603-610
140. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999;100:II247-256
141. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2002;123:1132-1140
142. Fedak PW. Paracrine effects of cell transplantation: Modifying ventricular remodeling in the failing heart. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;20:87-93
143. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kostering M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: The iact study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46:1651-1658
144. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2006;355:1222-1232
145. Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary stem cell transplantation in 191 patients with chronic heart failure: The star-heart study. *European journal of heart failure*. 2010;12:721-729
146. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: Clinical trial and preliminary results. *Japanese circulation journal*. 2001;65:845-847
147. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361:47-49
148. van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MP, de Roos A, Fibbe WE, Zwaginga JJ, Boersma E, Schalij MJ, Atsma DE. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: A randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;301:1997-2004

149. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, Thomas P, Bastian B, Chan JK, Lo G, Ho CL, Chan WS, Kwong RY, Parker A, Hauser TH, Chan J, Fong DY, Lau CP. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (protect-cad trial). *European heart journal*. 2007;28:2998-3005
150. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2004;94:92-95
151. Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, Zhu Z, Lin S, Kwan TW. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *The Journal of invasive cardiology*. 2006;18:552-556
152. Moscona AA. Tissues from dissociated cells. *Scientific American*. 1959;200:132-134 passim
153. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation*. 2000;102:III56-61
154. Fink C, Ergun S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14:669-679
155. Zhao YS, Wang CY, Li DX, Zhang XZ, Qiao Y, Guo XM, Wang XL, Dun CM, Dong LZ, Song Y. Construction of a unidirectionally beating 3-dimensional cardiac muscle construct. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2005;24:1091-1097
156. Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T. Heart muscle engineering: An update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovascular research*. 2006;71:419-429
157. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature medicine*. 2006;12:452-458
158. Guo XM, Wang CY, Tian XC, Yang X. Engineering cardiac tissue from embryonic stem cells. *Methods in enzymology*. 2006;420:316-338
159. Guo XM, Zhao YS, Chang HX, Wang CY, E LL, Zhang XA, Duan CM, Dong LZ, Jiang H, Li J, Song Y, Yang XJ. Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. *Circulation*. 2006;113:2229-2237
160. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature medicine*. 2006;12:459-465
161. Chen CH, Wei HJ, Lin WW, Chiu I, Hwang SM, Wang CC, Lee WY, Chang Y, Sung HW. Porous tissue grafts sandwiched with multilayered mesenchymal stromal cell sheets induce tissue regeneration for cardiac repair. *Cardiovascular research*. 2008;80:88-95
162. Wei HJ, Chen CH, Lee WY, Chiu I, Hwang SM, Lin WW, Huang CC, Yeh YC, Chang Y, Sung HW. Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair. *Biomaterials*. 2008;29:3547-3556
163. Simpson D, Liu H, Fan TH, Nerem R, Dudley SC, Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem cells*. 2007;25:2350-2357
164. Wu KH, Mo XM, Han ZC, Zhou B. Cardiac cell therapy: Pre-conditioning effects in cell-delivery strategies. *Cytotherapy*. 2012;14:260-266

165. Dayan V, Yannarelli G, Filomeno P, Keating A. Human mesenchymal stromal cells improve scar thickness without enhancing cardiac function in a chronic ischaemic heart failure model. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2012;14:516-520
166. Menasche P. Cardiac cell therapy trials: Chronic myocardial infarction and congestive heart failure. *Journal of cardiovascular translational research*. 2008;1:201-206
167. Soler-Botija C, Bago JR, Bayes-Genis A. A bird's-eye view of cell therapy and tissue engineering for cardiac regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1254:57-65
168. Forest VF, Tirouvanziam AM, Perigaud C, Fernandes S, Fusellier MS, Desfontis JC, Toquet CS, Heymann MF, Crochet DP, Lemarchand PF. Cell distribution after intracoronary bone marrow stem cell delivery in damaged and undamaged myocardium: Implications for clinical trials. *Stem cell research & therapy*. 2010;1:4
169. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: The lung barrier. *Transplantation proceedings*. 2007;39:573-576
170. Psaltis PJ, Zannettino AC, Gronthos S, Worthley SG. Intramyocardial navigation and mapping for stem cell delivery. *Journal of cardiovascular translational research*. 2010;3:135-146
171. Gavira JJ, Nasarre E, Abizanda G, Perez-Illarbe M, de Martino-Rodriguez A, Garcia de Jalon JA, Mazo M, Macias A, Garcia-Bolao I, Pelacho B, Martinez-Caro D, Prosper F. Repeated implantation of skeletal myoblast in a swine model of chronic myocardial infarction. *European heart journal*. 2010;31:1013-1021
172. Wu KH, Han ZC, Mo XM, Zhou B. Cell delivery in cardiac regenerative therapy. *Ageing research reviews*. 2012;11:32-40
173. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280
174. Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N, Fabiani JN, Carpentier AF. Cellular cardiomyoplasty: Clinical application. *The Annals of thoracic surgery*. 2004;77:1121-1130
175. Chachques JC, Azarine A, Mousseaux E, El Serafi M, Cortes-Morichetti M, Carpentier AF. Mri evaluation of local myocardial treatments: Epicardial versus endocardial (cell-fix catheter) injections. *Journal of interventional cardiology*. 2007;20:188-196
176. Skuk D, Goulet M, Tremblay JP. Use of repeating dispensers to increase the efficiency of the intramuscular myogenic cell injection procedure. *Cell transplantation*. 2006;15:659-663
177. Kofidis T, Akhyari P, Boublik J, Theodorou P, Martin U, Ruhparwar A, Fischer S, Eschenhagen T, Kubis HP, Kraft T, Leyh R, Haverich A. In vitro engineering of heart muscle: Artificial myocardial tissue. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2002;124:63-69
178. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology*. 1989;13:1637-1652
179. Fomovsky GM, Thomopoulos S, Holmes JW. Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48:490-496
180. Godier-Furnemont AF, Martens TP, Koeckert MS, Wan L, Parks J, Arai K, Zhang G, Hudson B, Homma S, Vunjak-Novakovic G. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:7974-7979
181. Terrovitis JV, Smith RR, Marban E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circulation research*. 2010;106:479-494
182. Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, Kajstura J, Bolli R. Concise review: Stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts. *Stem cells*. 2007;25:589-601
183. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nature biotechnology*. 2005;23:845-856

184. Little WC. The left ventricular dp/dtmax-end-diastolic volume relation in closed-chest dogs. *Circulation research*. 1985;56:808-815
185. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature*. 1980;288:551-556
186. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *The American journal of pathology*. 1999;155:1-5
187. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the hif system. *Nature medicine*. 2003;9:677-684
188. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. Elegans egl-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate hif by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001;107:43-54
189. Boardman KC, Swartz MA. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. *Circulation research*. 2003;92:801-808
190. Patwari P, Lee RT. Mechanical control of tissue morphogenesis. *Circulation research*. 2008;103:234-243
191. Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, Yao Q, Chen C. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:1817-1823
192. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circulation research*. 2002;91:877-887
193. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and rhoa regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell*. 2004;6:483-495
194. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677-689
195. Frederick JR, Fitzpatrick JR, 3rd, McCormick RC, Harris DA, Kim AY, Muenzer JR, Marotta N, Smith MJ, Cohen JE, Hiesinger W, Atluri P, Woo YJ. Stromal cell-derived factor-1alpha activation of tissue-engineered endothelial progenitor cell matrix enhances ventricular function after myocardial infarction by inducing neovasculogenesis. *Circulation*. 2010;122:S107-117
196. Matsumoto T, Asano T, Mano K, Tachibana H, Todoh M, Tanaka M, Kajiya F. Regional myocardial perfusion under exchange transfusion with liposomal hemoglobin: In vivo and in vitro studies using rat hearts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2005;288:H1909-1914
197. Kelleher CM, Vacanti JP. Engineering extracellular matrix through nanotechnology. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2010;7 Suppl 6:S717-729
198. Venugopal JR, Prabhakaran MP, Mukherjee S, Ravichandran R, Dan K, Ramakrishna S. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2012;9:1-19
199. Veetil JV, Ye K. Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications. *Biotechnology progress*. 2009;25:709-721
200. Stevenson LW, Miller LW, Desvigne-Nickens P, Ascheim DD, Parides MK, Renlund DG, Oren RM, Krueger SK, Costanzo MR, Wann LS, Levitan RG, Mancini D, Investigators R. Left ventricular assist device as destination for patients undergoing intravenous inotropic therapy: A subset analysis from rematch (randomized evaluation of mechanical assistance in treatment of chronic heart failure). *Circulation*. 2004;110:975-981

RESEARCH

Open Access

Repairing chronic myocardial infarction with autologous mesenchymal stem cells engineered tissue in rat promotes angiogenesis and limits ventricular remodeling

Pablo Maureira^{1,2,3,5*}, Pierre-Yves Marie^{3,4}, Fengxu Yu², Sylvain Poussier⁴, Yihua Liu^{1,2}, Frederique Groubatch², Aude Falanga² and Nguyen Tran^{2,3}

Abstract

Background: Tissue engineering scaffold constitutes a new strategy of myocardial repair. Here, we studied the contribution of a patch using autologous mesenchymal stem cells (MSCs) seeded on collagen-1 scaffold on the cardiac reconstruction in rat model of chronic myocardial infarction (MI).

Methods: Patches were cultured with controlled MSCs (growth, phenotype and potentiality). Twenty coronary ligated rats with tomoscintigraphy (SPECT)-authenticated transmural chronic MI were referred into a control group (n = 10) and a treated group (n = 10) which benefited an epicardial MSC-patch engraftment. Contribution of MSC-patch was tested 1-mo after using non-invasive SPECT cardiac imaging, invasive hemodynamic assessment and immunohistochemistry.

Results: 3D-collagen environment affected the cell growth but not the cell phenotype and potentiality. MSC-patch integrates well the epicardial side of chronic MI scar. In treated rats, one-month SPECT data have documented an improvement of perfusion in MI segments compared to control ($64 \pm 4\%$ vs $49 \pm 3\%$ $p = 0.02$) and a reduced infarction. Contractile parameter dp/dt_{max} and dp/dt_{min} were improved ($p < 0.01$). Histology showed an increase of ventricular wall thickness (1.75 ± 0.24 vs 1.35 ± 0.32 mm, $p < 0.05$) and immunochemistry of the repaired tissue displayed enhanced angiogenesis and myofibroblast-like tissue.

Conclusion: 3D-MSC-collagen epicardial patch engraftment contributes to reverse remodeling of chronic MI.

Keywords: Chronic myocardial infarction, Tissue engineering, Mesenchymal stem cell, Ventriculoplasty

Background

The reconstruction of a functional myocardium is the ultimate goal of the cardiac tissue engineering. However, the cell/tissue organization of the normal or the failing heart is evolving towards multifaceted changes in hierarchical architecture that leads inevitably to a functional complexity. Today, severe chronic condition of transmural myocardial infarction (MI) is hard to treat with conventional medical/surgical therapies. Some surgical ventriculoplasty techniques as aneurysmal zone's

exclusion [1-3], LV parietal resections [4], and/or limited LV dilatation by CorCap device [5] have been proposed to reshape the remodeled left ventricle. Despite some clinical benefits, a wider application of these strategies is somewhat compromised by difficulties inherent to ventriculectomy, condition of the beating heart and large LV scar that might impair thereafter systolic and diastolic functions [6]. Therefore, attempts of cardiac tissue repair are still challenging biotechnological objectives. Parietal tissue re-organization requires innovative solution to enhance the cell component along with (i) reduction in extracellular matrix alteration and with (ii) restoration of metabolic/perfusion conditions in severe infarct areas. Recently developed surgical reconstruction

* Correspondence: pablomaureira@hotmail.com

¹Department of Cardiovascular Surgery, University of Lorraine, Nancy, France

²School of Surgery, Faculty of Medicine, University of Lorraine, Nancy, France

Full list of author information is available at the end of the article



Sustained therapeutic perfusion outside transplanted sites in chronic myocardial infarction after stem cell transplantation

Pablo Maureira · Pierre-Yves Marie · Yihua Liu ·
Fengxu Yu · Sylvain Poussier · Fatima Maskali ·
Frédérique Groubatch · Gilles Karcher · Nguyen Tran

Received: 9 June 2012 / Accepted: 29 October 2012 / Published online: 13 February 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract This study aimed at comparing long-term variations in the perfusion of chronic myocardial infarction (MI) areas after local injections of autologous bone marrow stem cells (BMSCs). 14 coronary ligated rats with transmural chronic MI (4 months) were used: a control group ($n = 7$) versus a treated group ($n = 7$) in which ^{111}In labeled-BMSCs were directly engrafted on MI areas. By using $^{111}\text{In}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ SPECT and Sestamibi gated-SPECT, left ventricle perfusion and function were monitored in all animals by serial $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi pinhole gated-SPECT over a period of 6 months. Post-therapeutic myocardial perfusion improved as early as 48 h following injection in the 2 groups. This benefit was sustained during the 6-month follow-up in the non-engrafted MI-areas from treated rats (at 6-months: $+10 \pm 5\%$), whereas the engrafted ones, as well as the MI areas from control rats, exhibited progressive deterioration over time (at 6-months: $-9 \pm 10\%$ and $-5 \pm 3\%$, respectively). Perfusion enhancement of the chronic MI areas treated by BMSCs transplantation is: (1) marked in the

following days, presumably because of an unspecific inflammatory reaction, and (2) sustained over the long term but only outside the sites of cell engraftment, suggesting a distant paracrine effect of transplanted cells.

Keywords Myocardial infarction · Rats · Cell therapy · Sestamibi · ^{111}In -oxine · SPECT

Introduction

After myocardial infarction, the sustained local lack in myocardial perfusion is a crucial determinant of subsequent evolution toward left ventricular remodelling and heart failure [1]. Through the last decade, an emergent strategy based on the implantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) has been investigated [2–4]. Experimental studies have given evidence of an enhanced myocardial perfusion following the direct injection of BMSCs within areas of MI, even when performed after the acute stage [5–7] and thus, at a stage where patients may be routinely referred to a surgical myocardial revascularization. However, the specific effects of these cells remain unclear and various mechanisms may be involved: vasculogenesis in transplanted site [8, 9], secretion of angiogenic factors [4, 10], recruitment of resident cardiac stem cells but also, unspecific inflammatory reaction to the surgical way of intramyocardial injection [11].

We previously developed an *in vivo* pinhole-SPECT technique allowing: (1) the myocardial perfusion and function of rats to be serially monitored and (2) the site of engrafted ^{111}In -labeled BMSCs to be localized a few days after the direct injection of these cells within the MI areas from rats [7, 12]. In a preliminary study, the perfusion of

P. Maureira (✉) · Y. Liu · F. Yu · F. Groubatch · N. Tran
Faculty of Medicine, School of Surgery,
University of Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye,
54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France
e-mail: pablo.maureira@hotmail.com

P. Maureira
Department of Cardiovascular Surgery,
Nancy University Hospital, Nancy, France

P. Maureira · P.-Y. Marie · F. Maskali
INSERM U961, Faculty of Medicine, University of Lorraine,
Vandœuvre-lès-Nancy, France

P.-Y. Marie · S. Poussier · F. Maskali · G. Karcher
Nuclear Medicine Department, Nancy University Hospital,
Nancy, France

Residual Viability Is a Predictor of the Perfusion Enhancement Obtained With the Cell Therapy of Chronic Myocardial Infarction

A Pilot Multimodal Imaging Study

Pablo Maureira, MD,*†‡ Nguyen Tran, PhD,†‡ Wassila Djaballah, MD,§|| Michaël Angioi, MD,¶
 Danièle Bensoussan, PharmD, PhD,‡ Nicolas Didot, MD,§ Renaud Fay, PharmD,** Nicolas Sadoul, MD,¶
 Jean-Pierre Villemot, MD, PhD,*† and Pierre-Yves Marie, MD, PhD‡§

Purpose: Up to now, there has been limited investigation into cell therapy in the chronic phase of severe myocardial infarction (MI), and many questions remain concerning the contribution of the engrafted cells and especially their impact on the reperfusion of MI areas, when assessed by objective quantitative imaging techniques. This randomized pilot SPECT, PET, and MRI study was aimed at assessing the effects of bone marrow mononuclear cells (BMNCs) when implanted in areas of severe and chronic MI.

Materials and Methods: Fourteen patients, who were referred for coronary artery bypass grafting (CABG) and in whom a screening MIBI-SPECT revealed severely damaged myocardium (<50% uptake under nitrate), were randomized between a cell therapy group (n = 7; CABG and injection of BMNCs within MI areas) and a control group (n = 7; CABG alone).

Results: The MI areas exhibited a posttherapeutic enhancement in the rest-uptake of MIBI in the cell therapy group [difference between 6-month control and baseline: +6.8% (5.4%), $P = 0.03$] but not in the control group [+1.0% (4.3%)]. However, in a per-patient analysis, this improvement was significant (> +9%) in only 3 cell therapy patients, whose MI areas before therapy had a higher FDG uptake [59% (9%) vs 38% (8%), $P = 0.03$] and a lower transmural extent at MRI [40% (6%) vs 73% (18%), $P = 0.03$] when compared with the other cell therapy patients.

Conclusions: Perfusion enhancement, obtained with BMNCs in areas of chronic MI, might require an intermediate level of viability documented with FDG-PET and MRI and that totally necrotic MI seems refractory to this cell therapy technique.

Key Words: MIBI-SPECT, myocardial viability, FDG-PET, MRI, cell therapy (*Clin Nucl Med* 2012;37: 738–742)

Previous reports have shown that cardiac cell therapy with unselected bone marrow mononuclear cells (BMNCs)^{1–2} or with selected subtypes^{3–11} is associated with some improvement in myocardial perfusion and cardiac function in patients with recent myocardial infarction (MI). Up to now, however, there have been limited investigations into the chronic phase of MI,^{12–14} and many questions remain concerning the contribution of the engrafted cells and especially their impact in late myocardial reperfusion, according to the stage of MI and to its severity.

Therefore, by using objective quantitative imaging techniques, this pilot study aimed to determine whether cell therapy with BMNCs

offers a real improvement, when applied to patients referred for coronary artery bypass grafting (CABG) and despite the presence of chronic MI areas, commonly considered to be severely damaged by a screening nitrate-enhanced MIBI-SPECT.^{15–17} This randomized study involved a direct comparison between patients treated or not by cell therapy, and it was conducted with a multimodal imaging protocol involving MIBI-SPECT, ¹⁸F-FDG PET, and MRI to provide a comprehensive assessment of the 6-month evolutions of cardiac perfusion, metabolism, and contractility.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

The study protocol was approved by the local ethical committee and by the French Administration (AFSSAPS, protocol no. TC175), and all study patients gave signed informed consent to participate. These patients were prospectively recruited among those referred for CABG in our institution, with ages ranging from 18 to 75 years and with more than a 2-month history of MI. They were referred to a screening nitrate-enhanced MIBI-gated SPECT and included if they fulfilled the following criteria: (1) left ventricular (LV) ejection fraction (EF) ranging from 30% to 50% and (2) the presence, on the 17-segment model,¹⁸ of at least 2 contiguous LV segments with severe contractility abnormalities and less than 50% of MIBI uptake, a criterion of irreversibly damaged myocardium.^{15–17}

Main exclusion criteria were as follows: (1) unstable angina or cardiac insufficiency; (2) congenital or valvular cardiac disease, hypertrophic or idiopathic cardiomyopathy, or LV aneurysm requiring surgery; (3) history of severe arrhythmia (except those occurring at the acute phase of MI); (4) history of cancer; (5) hematologic, immunologic, or inflammatory disease; (6) severe renal disease defined as GFR less than 30 mL/min; (7) chronic liver disease classified as Child-Pugh class B or C; (8) contraindication to MRI; and (9) women with childbearing potential.

Study Organization

After inclusion, the patients were referred for FDG-PET and MRI. Cardiac surgery was performed less than 15 days after completion of these investigations.

Surgical technical modalities were defined before the randomization process. The myocardial segments with low viability, which were targeted for cell therapy, were defined as those exhibiting an uptake of MIBI under nitrate, which was less than 50% with regard to the maximal LV voxel value^{15–17} and extending over at least 50% of the projected segment area, the segment areas being defined on the 17-segment model.¹⁸ Coronary artery territories requiring CABG were those exhibiting more than 70% stenosis and involving one or more viable segments (ie, segments that were not those with low viability, as defined above).

Patients were randomly assigned to a cell therapy group (CABG and cell therapy) or to a control group (CABG alone) according to

Received for publication November 4, 2011; revision accepted December 28, 2011.
 From the *Department of Cardio-Vascular Surgery, CHU-Nancy; †School of Surgery, Faculty of Medicine, Nancy University; ‡INSERM, U961; §Department of Nuclear Medicine, CHU-Nancy; ||INSERM, U947; ¶Department of Cardiology and #Unit of Cell Transplantation and Tissue, CHU-Nancy; and **INSERM, Centre d'Investigation Clinique CIC-P 9501, Nancy, France.
 Supported by the French Ministry of Health for financial support (Projet Hospitalier de Recherche Clinique, 2004).
 Reprints: Pierre-Yves Marie, MD, PhD, Department of Nuclear Medicine, Hôpital de Bichat, CHU-Nancy, Allée du Morvan, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. E-mail: pymarie@chu-nancy.fr.
 Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins
 ISSN: 0363-9762/12/3708-0738