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 Yihua LIU

Une nouvelle approche thérapeutique de l'insuffisance cardiaque ischémique associant l'assistance biologique et l'assistance mécanique

Membres du Jury :

Rapporteurs:

M. Juan-Carlos CHACHQUES Professeur - Université Paris V, France

M. Sylvain PERRUCHE Chargé de recherche - Inserm UMR1098, Besançon, France

Examinateurs :

M. Christian PINSET Directeur de recherche – Inserm UMR 861, Paris, France

M. Pierre-Yves MARIE PU-PH - Université de Lorraine, France (Directeur de thèse)

M. Nguyen TRAN MCU - Université de Lorraine, France (co-directeur)

M. Juan-Pablo MAUREIRA Professeur - Université de Lorraine, France (co-directeur)

Invités :

M. Jean-Pierre VILLEMOT Professeur - Université de Lorraine, France

M. Cesare TERRACCIANO Professeur – Imperial College of London, Angleterre

UMR_S U 1116, Défaillance cardiovasculaire aigüe et chronique

9 avenue Forêt de Haye, 54505 VANDOEUVRE-LÈS-NANCY

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance et toute ma considération à **Monsieur le Professeur Jean-Pierre Villemot**, Directeur honoraire de l'Ecole de chirurgie, pour la grande confiance qu'il m'a témoignée ainsi que pour son soutien constant.

Je tiens ensuite à remercier **Monsieur le Docteur Nguyen Tran** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour les connaissances scientifiques qu'il m'a transmises ainsi que pour ses précieux conseils et commentaires.

Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur Pierre-Yves Marie**. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance en acceptant de devenir mon directeur de thèse. Merci pour son encadrement et pour tous les conseils scientifiques qu'il m'a prodigués. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus grand respect.

J'adresse en outre mes vifs remerciements à **Monsieur le Docteur Juan-Pablo Maureira** pour son encadrement scientifique ainsi que pour sa disponibilité et son soutien constant. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance et de mon amitié sincère.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire de l'Ecole de Chirurgie pour leur accueil bienveillant et leur aide scientifique, expérimentale et intellectuelle, notamment Mesdames **Frédérique Groubatch-Joineau**, **Aude Falanga**, **Vanessa Marie**, **Mariam Chaze** et **Marion Bernard**. Je remercie également l'équipe de **Nancyclotep**.

Enfin, je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de diriger/juger ce travail.

Liste des abréviations

AAo abdominal aorta, aorte abdominale

ACC American College of Cardiology

AHA American Heart Association

ANP atrial natriuretic peptide, peptide natriurétique atrial

Asc Ao ascending aorta, aorte ascendante

ATP adenosine triphosphate, adénosine triphosphate

AVC accident vasculaire cérébral

BMSC bone marrow stem cells, cellules souches dérivées de la moelle osseuse

BNP brain natriuretic peptide, peptide natriurétique cérébral

CD cluster of differentiation, marqueur de différentiation

CFU colony forming units, unité formant des colonies

CO cardiac output, débit cardiaque

CSCs cellules souches cardiaques

CSEs cellules souches embryonaires

CSHs cellules souches hématopoïétiques

CSMs cellules souches mésenchymareuses

CT-1 cardiotrophine-1

CU complete unloaeding, décharge complète

DAPI 4,6-diamidino-2-phynylindole

DAV dispositif d‟assistance ventriculaire

***E*es** end-systolic elastance, élastance télé-systolique

EDP end diastolic pressure, pression télé-diastolique

EGFP enhanced green fluorescent protein

ESP end systolic pressure, pression télé-systolique

^{18}FDG 2-deoxy-2-(^{18}F)fluoro-D-glucose

FE fraction d‟éjection

GFP green fluorescent protein

GM-CSF Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

HDACS histone deacetylases

HES hematoxylin-eosin staining, coloration à l‟hématoxyline-éosine

HHLT heterotopic heart-lung transplantation, transplantation hétérotopique cœur-poumon

HHT heterotopic heart transplantation, transplantation cardiaque hétérotopique

HIF hypoxia inducible factor, facteur inductible parl‟hypoxie

HLA human leucocyte antigen, antigène de leucocyte humain

HR heart rate, fréauence cardiaque

IC insuffisance cardiaque/ HF heart failure

ICAM intercellular adhesion molecule

IDM infarctus du myocarde/MI myocardial infarction

IEC inhibiteurs de l‟enzyme de conversion

IL interleukine

IMDM Iscove‟s modified Dulbecco‟s culture medium

INF/IFN interferon, interféron

iPSCs induced pluripotent stem cells,cellules souches pluripotentes induites

IVC inferior vena cava, veine cave inférieure

IVSD inter-ventricular septum thickness at end diastole, épaisseur télé-diastolque du septum intraventriculaire

LA left atrium, oreillette gauche

LAD left anterior descending artery

LIF leukemia inhibitory factor

LPWT left ventricular posterior wall thickness, épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche

LV left ventricle, ventricule gauche

LVAD left ventricular assist devices, dispositifs d‟assistance ventriculaire gauche

LVDd left ventricular end-diastolic dimension, dimension télé-diastolique du ventricule gauche

LVDs left ventricular end-systolic dimension, dimension télé-systolique du ventricule gauche

MAPK mitogen-activated protein kinase

MCP monocyte chemoattractant protein, protéine chimiotactique monocytaire

MEC matrice extracellulaire

MEF myocyte enhancer factor

MIP macrophage inflammatory protein

MMPs métalloprotéinases matricielles

NFAT facteur nucléaire des lymphocytes activés

NYHA New York heart Association

PA pulmonary artery, artère pulmonaire

PBS phosphate buffered saline, solution saline tamponnée au phosphate

PECAM platelet endothelial cell adhesion molecule,

PET positron emission tomography, tomographie par émission de positons

PRSW preload recruited stroke work, travail systolique recruté par la pré-charge

PU partial unloading, décharge partielle

PV pulmonary vein, veine pulmonaire

P-V pression-volume

RA right atrium, oreillette droite

RV right ventricle, ventricule droit

SPECT single-photon emission computerized tomography, tomographie par émission de photon unique

STAT signal transducer and activator of transcription

SV stroke volume, débit systolique

SVC superior vena cava, veine cave supérieure

SW stroke work, travail systolique

TCH transplantation cardiaque hétérotopique

TGF transforming growth factor

TIMPs inhibiteurs tissulaires de la métalloprotéinase matricielle

TNF tumor necrosis factor, facteur de nécrose tumorale

TNFR tumor necrosis factor receptor, récepteur du facteur de nécrose tumorale

TSP thrombospondine

VEGF vascular endothelial growth factor, facteur de croissance endothélial vasculaire

VG ventricule gauche/LV left ventricle

Listes des illustrations

Figure 1:Les mécanismes du remodelage ventriculaire pathologique. 21

Figure 2:Le remodelage ventriculaire post-infarctus 23

Figure 3:La cicatrisation post-IDM et le remodelage ventriculaire 24

Figure 4:la cicatrisation et le remodelage post-infarctus. 26

Figure 5:La zone bordante. 28

Figure 6:: L'induction des cytokines inflammatoires après l'IDM et leurs rôles dans le remodelage cardiaque aigu et chronique. 32

Figure 7:Les types de cellules souches utilisées dans les études cliniques. 43

Figure 8: Les types de cellules et les voies d'administration dans la thérapie cellulaire cardiaque. 45

Figure 9: La régénération myocardique avec un modèle canin de transplantation cardiaque orthotopique. 48

Figure 10: Le remodelage inversé avec les DAVs. 53

Figure 11:DAVs pulsatiles et DAVs avec flux en continu. 55

Figure 12: Deux modèles murins de transplantation cardiaque hétérotopique. 58

Figure 13: Les mécanismes possibles sous-jacents de la thérapie cellulaire cardiaque. 132

Figure 14: L'impact de la thérapie avec des CSMs sur l'angiogénèse. 134

Figure 15: L'évolution morphologique et fonctionnelle cardiaque au fil du temps avec les DAVs. 143

Figure 16: Les procédures de TCH cœur seul. 158

Figure 17: Les procédures de TCH fémorale avec cuff technique 161

Figure 18: Echocardiographie avec coupes différentes. 164

Figure 19: Les boucles de pression-volume obtenus par le cathéter de conductance. 166

Figure 20: Les paramètres obtenus avec le 18F-FDG TEP. 169

Table 1:Comparaison des stades de l'IC selon l'ACCF/AHA et classification fonctionnelle de NHYA 19

Table 2:Les stratégies thérapeutiques et leurs cibles spécifiques dans la réparation cardiaque. 31

Table 3: Résumé de la thérapie cellulaire cardiaque avec des CSMs [107] 49

Table de matières

Remerciements 1
Liste des abréviations 2
Listes des illustrations 6
Résumé 10
1. Introduction générale 14
2. Etude bibliographique 18
2.1 L'insuffisance cardiaque et son épidémiologie 19
2.2 L'insuffisance cardiaque et le remodelage ventriculaire 20
2.3 Le remodelage ventriculaire dans les cardiopathies ischémiques 22
2.4 La cicatrisation post-infarctus et le remodelage ventriculaire : d'un point de vue temporel 22
2.4.1 La phase d'inflammation ou de cicatrisation précoce (0-7 jours post-infarctus) : 24
2.4.2 La phase de granulation ou de remodelage précoce (7-21 jours post-IDM) : 24
2.4.3 La phase de remodelage tardif (> 21 jours post-IDM) : 25
2.5 Le remodelage ventriculaire post-infarctus : d'un point de vue spatial 25
2.5.1 La zone infarcie 25
2.5.2 La zone bordant l'infarctus 27
2.5.3 La zone éloignée de l'infarctus 29
2.6 Les cytokines inflammatoires et le remodelage post-infarctus 31
2.6.1 Les déclencheurs de la production de cytokines post-infarctus 32
2.6.2 Le mécanisme de l'amplification des cytokines 33
2.6.3 Les effets pléiotrophiques des cytokines dans la réparation cardiaque 34
2.6.4 Le TNF-α 34
2.6.5 La famille de l'IL-1 35
2.6.6 La famille de l'IL-6 36
2.6.7 L'IL-10 37
2.6.8 Le TGF-β 37
2.6.9 Les approches anti-inflammatoires sont-elles efficaces pour réduire la lésion myocardique post-infarctus ? 39
2.6.10 La modulation de la réponse inflammatoire et le remodelage cardiaque 40
2.7 La régénération cardiaque est-elle une stratégie thérapeutique réaliste ? 41
2.7.1 Les types de cellules souches 42
2.7.2 Les cellules souches embryonnaires (CSEs) 43
2.7.3 Les cellules souches pluripotentes inductibles (iPSCs) 44

2.7.4 Les myoblastes squelettiques 44
2.7.5 Les cellules souches dérivées de la moelle osseuse 45
2.7.6 Les cellules souches cardiaques (CSCs) 47
2.7.7 Les cardiosphères 48
2.7.8 Résumé de la thérapie cellulaire cardiaque 49
2.8 L'oxygène : élément crucial dans la biologie des cellules souches 50
2.8.1 Le rôle régulateur de l'oxygène sur la biologie des CSMs 51
2.8.2 L'assistance ventriculaire mécanique et le remodelage inverse 51
2.8.3 Différents types de DAVs 54
2.8.4 Transplantation cardiaque hétérotopique : un modèle animal pour simuler les DAVs 56
3. Méthodes et résultats 59
3.1 Etude n°1: Etude de la perfusion myocardique chez le rat atteint de l'infarctus chronique traitée par l'injection des cellules souches mésenchymateuses en intramyocardique 61
3.2 Etude n°2: La culture cellulaire en hypoxie à long terme améliore les effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses murines autologues de la moelle osseuse pour traiter l'infarctus chronique du myocarde 83
3.3 Etude n°3. L'impact de la décharge ventriculaire chronique sur le remodelage myocardique : l'évaluation multimodale de deux techniques de transplantation hétérotopique chez le rat 108
4. Discussion 130
4.1 Etude n°1: Etude de la perfusion myocardique chez le rat atteint de l'infarctus chronique traitée par l'injection des cellules souches mésenchymateuses en intramyocardique 131
4.2 Etude n°2: La culture cellulaire en hypoxie à long terme améliore les effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses murines autologues de la moëlle osseuse pour traiter l'infarctus chronique du myocarde 137
4.3 Etude n°3. L'impact de la décharge ventriculaire chronique sur le remodelage myocardique : l'évaluation multimodale de deux techniques de transplantation hétérotopique chez le rat 142
5. Conclusion et Perspectives 147
5.1 Le marquage cellulaire pour tracer les cellules injectées *in vivo*, détecter leurs devenirs et mieux comprendre leur contribution relative dans la réparation cardiaque. 149
5.2 Les cellules souches cardiaques (CSCs) sont-elles un meilleur candidat pour la thérapie cellulaire ? 150
5.3 L'application des modèles de TCH aux animaux pathologiques 150
5.4 La combinaison de l'assistance biologique et l'assistance mécanique. 150
6. Annexe 152
6.1 Prélèvement et culture des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) 153
6.2 La ligature coronaire 154

6.3 Trois technique de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH) chez les rats 155
6.4 Echocardiographie chez le rat 162
6.5 Le cathéter de conductance pression-volume ventriculaire..... 165
6.6 2-déoxy-2[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F-FDG) tomographie par émission de positron (TEP) chez le rat 168
7. Référence..... 171

Une nouvelle approche thérapeutique de l'insuffisance cardiaque ischémique associant l'assistance biologique et l'assistance mécanique

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) chronique représente la pathologie la plus fréquente nécessitant l'hospitalisation chez les patients de plus de 65 ans. La mortalité à 5 ans est estimée à plus de 50% et les enjeux en terme d'économie et de santé publique sont immenses. Parmi de nombreuses étiologies, les cardiopathies ischémiques sont la cause principale de l'IC.

Sur les quinze dernières années, de nombreuses études précliniques et cliniques ont confirmé le potentiel thérapeutique des cellules souches d'améliorer la fonction cardiaque et d'atténuer le remodelage ventriculaire. Néanmoins, beaucoup de questions fondamentales liées à la thérapie régénératrice avec les cellules souches restent à résoudre. Parmi les raisons expliquant l'inefficacité de la thérapie cellulaire figurent l'intégration et la survie compromises des cellules greffées dans un microenvironnement défavorable au sein de tissus infarcis ainsi que la présence d'inflammation, de stress oxydatif, d'hypoxie sévère et de privation des nutriments. Une des approches pour améliorer la thérapie cellulaire serait d'adapter le milieu de culture des cellules *in vitro* en terme de concentration en oxygène afin qu'il soit plus proche des conditions *in vivo*. Notre étude a bien montré que le préconditionnement des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) à l'hypoxie permettait de promouvoir la croissance cellulaire tout en gardant leur potentiel de différenciation trilignée. De plus, notre étude *in vivo* montrait que les CSMs cultivées en hypoxie, par rapport à celles cultivées en normoxie, présentaient un meilleur potentiel thérapeutique : amélioration de la viabilité dans la zone infarcie, augmentation de la contractilité intrinsèque et favorisation du processus d'angiogénèse, etc.

Force est de constater que la récupération de la fonction cardiaque sous dispositifs d'assistance ventriculaire (bridge to recovery) pose un jalon dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Le phénomène « bridge to recovery » nous a permis d'approfondir la connaissance sur la physiopathologie du remodelage ventriculaire, qui était considéré comme un processus unidirectionnel. Cependant, plusieurs controverse existent sur la stratégie „Bridge to Recovery". Une des questions les plus soulevées est s'il y a une limite à la durée et à l'intensité de la décharge ventriculaire afin d'éviter ses effets secondaires. Pour simuler les décharges

mécaniques ventriculaires d'intensités différentes, nous avons mis au point deux modèles de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH), cœur seul ou cœur-poumon, mimant respectivement la décharge complète et la décharge partielle. Notre étude montrait que la décharge mécanique résultait d'une atrophie myocardique, d'une réduction du métabolisme glucidique, d'une fibrose cardiaque et d'une altération de fonction cardiaque diastolique. Les effets étaient tous dépendants des intensités de décharge.

Notre travail s'insère dans la thématique générale du laboratoire, qui est de développer un programme de recherche sur les approches thérapeutiques innovantes pour traiter l'infarctus du myocarde et l'IC chronique. Dans la première partie de notre projet, nous avons cherché à clarifier les effets de l'injection intramyocardique de CSMs d'origine médullaire dans la zone infarcie sur la perfusion et la fonction cardiaque (étude n°1). Nous avons ensuite étudié l'impact de la culture cellulaire en hypoxie des CSMs dérivées de moelle osseuse sur leurs caractéristiques biologiques et leur potentiel thérapeutique (étude n°2). Enfin, nous avons caractérisé les effets de décharges mécaniques d'intensités différentes sur le remodelage ventriculaire du cœur sain, sur le plan morphologique, fonctionnel et métabolique (étude n°3).

Mots clés : Insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde, thérapie cellulaire, cellules souches mésenchymateuses, dispositifs d'assistance ventriculaire, transplantation cardiaque hétérotopique

An innovative therapeutic strategy of ischemic heart failure associating regenerative therapy and mechanical assist

Abstract

Heart failure (HF) represents one of the most frequent disease requiring hospitalization in the old population (>65 years old). The 5-year survival rates associated with heart failure are less than 50% and it results in a huge cost on social economy and public health. Ischemic heart diseases represent one of the most frequent etiologies of the heart failure.

Over the last fifteen years, many preclinical and clinical studies have confirmed the therapeutic potential of stem cells to improve heart function and reduce ventricular remodeling.

The failure of cell therapy can be ascribed to some extent to the poor integration and compromised survival of grafted cells in an unfavorable microenvironment in infarcted tissue which is complicated by the presence of inflammation, oxidative stress, hypoxia and severe deprivation of nutriments. Furthermore, bone marrow stem cells are physiologically located in a hypoxic environment. The adaptation of the *in vitro* culture medium, in terms of oxygen concentration, to the *in vivo* natural niche as well as the targeted area, might be one of solutions to improve the efficacy of cell therapy. One of our studies has demonstrated that preconditioning of mesenchymal stem cells (MSCs) with hypoxia could promote cell proliferation without altering the differentiation potential. What‟s more, our *in vivo* study showed that hypoxia-preconditioned MSCs, compared with those cultured in normoxia, presented with better therapeutic efficiency, such as improvement of the myocardial viability in the infarcted area, increase of intrinsic contractility and favoring the processes of angiogenesis.

The recovery of cardiac function with ventricular assist devices (bridge to recovery) is a milestone in the treatment of heart failure. The phenomenon "bridge to recovery" has enabled us to deepen the knowledge on the physiopathology of ventricular remodeling, which was considered to be a one-way process. However, the strategy of „Bridge to Recovery‟ causes many controversies. One of the arisen questions is if there exists a limit in terms of the duration and intensity regarding the mechanical unloading in order to minimize its secondary complications. To simulate ventricular mechanical unloading of different intensities, we have developed two models of heterotopic heart transplantation (TCH), namely, heterotopic heart transplantation (HHT) and heterotopic heart-lung transplantation to simulate complete and partial unloading, respectively. Our study revealed that mechanical unloading resulted in myocardial atrophy, cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. These secondary effects were dependent on the intensity of unloading.

Our work fits into the general theme of the laboratory, which is to develop a research program on innovative therapeutic approaches to treat myocardial infarction and chronic heart failure. In the first part of our study, we sought to clarify the effects of bone marrow-derived MSCs following intramyocardial injection on the perfusion and function of the infarcted myocardium (study 1). We then investigated the impact of long-term hypoxic culture on the biological characteristics and therapeutic potential of MSCs (study 2). Finally, we explored the

effects of mechanical unloading of different intensities on the structure, function and metabolism of healthy myocardium (Study 3).

Key words: Heart failure, myocardial infarction, cell therapy, mesenchymal stem cells, ventricular assist devices, heterotopic heart transplantation

1. Introduction générale

L'insuffisance cardiaque (IC) chronique représente la pathologie la plus fréquente nécessitant l'hospitalisation chez les patients de plus de 65 ans1. Malgré le progrès des approches thérapeutiques médicales et chirurgicales, la survie à 5 ans reste médiocre à 50 % et détériore grandement à 20 % chez les patients de stades D[1](Tableau 1). Parmi de nombreuses étiologies, les cardiopathies ischémiques sont la cause principale de l'IC. L'IC chronique post-infarctus est caractérisée par une réaction inflammatoire soutenue, une perte inexorable des unités contractiles et une cicatrisation avec des tissus fibrotiques. Ces éléments apparaissent de façon concomitante et aboutissent à une altération structurale et fonctionnelle cardiaque, autrement dit, au remodelage ventriculaire[2,3].

Actuellement, le traitement pharmacologique permet de soulager les symptômes et de prolonger la survie, mais il reste palliatif dans le sens qu'il ne peut pas résoudre le problème fondamental[4] qu'est la perte des tissus fonctionnels. C'est pourquoi, un nouveau concept de thérapie régénératrice du tissu infarci avec cellules souches a suscité un immense intérêt. Sur les quinze dernières années, de nombreuses études précliniques et cliniques ont confirmé le potentiel thérapeutique des cellules souches pour améliorer la fonction cardiaque et atténuer le remodelage ventriculaire[5,6]. Néanmoins, beaucoup de questions fondamentales liées à la thérapie régénératrice avec cellules souches restent à résoudre et jusqu'à ce jour, les seules certitudes sont : (1) la thérapie cellulaire est sans danger, (2) la thérapie cellulaire possède une efficacité modérée, et (3) chez l'homme, les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) dérivées de moelle osseuse ne se transdifférencient pas en cardiomyocytes ou en cellules composantes vasculaires (ou la transdifférenciation n'est pas suffisante pour avoir un effet)4. Les espoirs énormes placés dans la thérapie cellulaire, dont l'efficacité réelle est finalement sous-optimale, nous obligent à améliorer la technique elle-même ou à trouver une stratégie alternative.

Parmi les raisons expliquant l'inefficacité de la thérapie cellulaire figurent l'intégration et la survie compromise des cellules greffées dans un microenvironnement défavorable au sein de tissus infarcis ainsi que la présence d'inflammation, de stress oxydatif, d'hypoxie sévère et de privation des nutriments[7,8]. De plus, la localisation dans la moelle osseuse des cellules souches est physiologiquement hypoxique[9]. L'adaptation du milieu de culture *in vitro*, en terme de

concentration en oxygène, à l'environnement *in vivo* dans la niche naturelle ainsi que dans la cible thérapeutique, constitue une des approches pour améliorer l'effet de thérapie cellulaire. Dans la littérature[10–12], il a été rapporté que le préconditionnement de cellules souches à l'hypoxie a un effet bénéfique pour traiter les cardiopathies ischémiques.

Quoiqu'il en soit, la thérapie régénératrice, par les substances cellulaires ou par l'ingénierie tissulaire, a pour objectif de réparer ou de remplacer les tissus lésés. Etant donné que la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque post-infarctus est également due à la compensation/décompensation du myocarde éloigné de la zone infarcie, qui subit une surcharge de pression et/ou de volume, l'approche thérapeutique visant à protéger les cardiomyocytes exonérés de lésion ischémique mais souffrant de la surcharge mécanique devient une stratégie justifiée. Force est de constater que la récupération de la fonction cardiaque sous dispositifs d'assistance ventriculaire[13–15] (*bridge to recovery*) pose un jalon dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Le phénomène « *bridge to recovery* » nous a permis d'approfondir la connaissance sur la physiopathologie du remodelage ventriculaire, qui était considéré comme un processus unidirectionnel. Cependant les mécanismes de remodelage inverse restent mal connus. Il a été rapporté que les effets bénéfiques associés à la thérapie d'assistance mécanique seraient dus (1) à la régression de l'hypertrophie des cardiomyocytes, (2) à la régulation à la hausse des récepteurs β-adrénergiques et des protéines sarcomériques et (3) à la normalisation de l'environnement neuro-hormonal.

Mais aucune option n'est parfaite. Les désavantages associés à la thérapie d'assistance mécanique sont : (1) le taux de *bridge to recovery* reste bas, aux alentours de 10 %[16,17], (2) la récidive de l'IC après le sevrage de dispositifs reste élevée[18] et (3) la décharge ventriculaire mécanique de longue durée peut provoquer une atrophie myocardique[19] qui peut être défavorable pour le remodelage inverse. Ces observations soulèvent la question de savoir s'il y a une limite à la durée et à l'intensité de la décharge ventriculaire afin d'éviter leurs effets secondaires. Pour simuler les décharges mécaniques ventriculaires d'intensités différentes, nous avons mis au point deux modèles de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH), cœur seul ou cœur-poumon, pour simuler respectivement la décharge complète et la décharge partielle.

Notre travail s'insère dans la thématique générale du laboratoire, qui est de développer un

programme de recherche sur les approches thérapeutiques innovantes pour traiter l'infarctus du myocarde et l'IC chronique. Dans la première partie de notre projet, nous avons cherché à clarifier les effets de l'injection intramyocardique de CSMs d'origine médullaire dans la zone infarcie sur la perfusion et la fonction cardiaque (étude n°1). Nous avons ensuite étudié l'impact de la culture cellulaire en hypoxie des CSMs dérivées de moelle osseuse sur leurs caractéristiques biologiques et leur potentiel thérapeutique (étude n°2). Enfin, nous avons caractérisé les effets de décharges mécaniques d'intensités différentes sur le remodelage ventriculaire du cœur sain, sur le plan morphologique, fonctionnel et métabolique (étude n°3).

2. Etude bibliographique

2.1 L'insuffisance cardiaque et son épidémiologie

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe caractérisé par l'inefficacité de remplissage et/ou d'éjection du sang qui résulte de l'altération délétère structurale ou fonctionnelle[20]. Les manifestations cardinales de l'IC sont la dyspnée et la fatigue, lesquelles engendrent une intolérance à l'effort et une surcharge hydrique vasculaire, cette dernière est responsable de la congestion pulmonaire et/ou des œdèmes périphériques.

Selon l'*American Heart Association*, l'incidence de l'IC est restée stable au cours des dernières décennies, avec plus de 650 000 nouveaux cas chaque année ; la prévalence de l'IC continue de s'accroître, avec environ 5,1 millions de patients porteurs des symptômes cliniques aux Etats-Unis actuellement[1]. La survie est améliorée grâce aux progrès en matière d'approches thérapeutiques médicales et chirurgicales mais la mortalité absolue à 5 ans à partir du diagnostic reste médiocre à environ 50 %. D'après une étude de cohorte, la survie à 5 ans pour les patients avec IC de stade A, B, C, D est respectivement de 97 %, 96 %, 75 % et 20 %[1].

Table 1:Comparaison des stades de l'IC selon l'ACCF/AHA et classification fonctionnelle de NHYA

Stades de l'IC (ACC/AHA)		Classification fonctionnelle (NYHA)	
A	Présence de haut risque, mais absence de pathologies structurales et les symptômes de l'IC	**None**	
B	Présence de pathologies structurales mais absence de symptômes de l'IC	**I**	Activités physiques non limitées; absence de symptômes de l'IC à l'effort ordinaire
C	Présence de pathologie structurale et les symptômes de l'IC	**I**	Activités physiques non limitées; absence de symptômes de l'IC à l'effort ordinaire
		II	Activités physiques moyennement limitées; présence de symptômes de l'IC à l'effort ordinaire
		III	Activités physiques très limitées, asymptomatique au repos, mais les activités quotidiennes provoquent des symptômes de l'IC
D	L'IC réfractaire nécessitant des interventions spécialisées	**IV**	Symptomatique au repos

ACC, American College of Cardiology ; AHA, American Heart Association ; NYHA, New York Heart Association; IC, insuffisance cardiaque (d'après Yancy *et al*[1], circulation 2013).

En fonction des valeurs de la fraction d'éjection (FE), l'IC peut être classifiée en deux catégories : l'IC avec FE conservée (> 40 %) et l'IC avec FE réduite (≤ 40 %). La plupart des approches thérapeutiques actuelles et des études cliniques sont visées à l'IC avec FE réduite. De plus, les traitements pharmacologiques classiques tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les inhibiteurs du récepteur d'angiotensine et les β-bloquants se sont révélés inefficaces pour l'IC avec FE réduite. Les étiologies de l'IC sont : cardiopathie ischémique aiguë ou chronique, surcharge de volume ou de pression (p. ex. valvulopathies, hypertension artérielle), myocardiopathie dilatée idiopathique, infection, toxines et anomalie génétique, etc. Notre travail a abordé spécialement l'IC ischémique, une séquelle des cardiopathies coronaires.

2.2 L'insuffisance cardiaque et le remodelage ventriculaire

Les manifestations cliniques de l'IC correspondent aux altérations structurales et fonctionnelles des cellules myocardiques et de la matrice extracellulaire. Ces processus sont généralement appelés « remodelage ventriculaire »[3,21] (**figures 1, 2**), lequel consiste en : (1) hypertrophie cellulaire ; (2) perte progressive des cellules myocardiques suite à la nécrose, apoptose et autophage ; (3) augmentation des collagènes totaux, modification des sous-types de collagènes et organisation tridimensionnelle ; (4) modification du couplage excitation-contraction conduisant à l'altération de la contractilité des cardiomyocytes ; (5) désensibilisation des récepteurs β-adrénergiques ; (6) balance énergétique anormale du myocarde, secondaire à l'anomalie mitochondriale, et altération des substrats métaboliques.

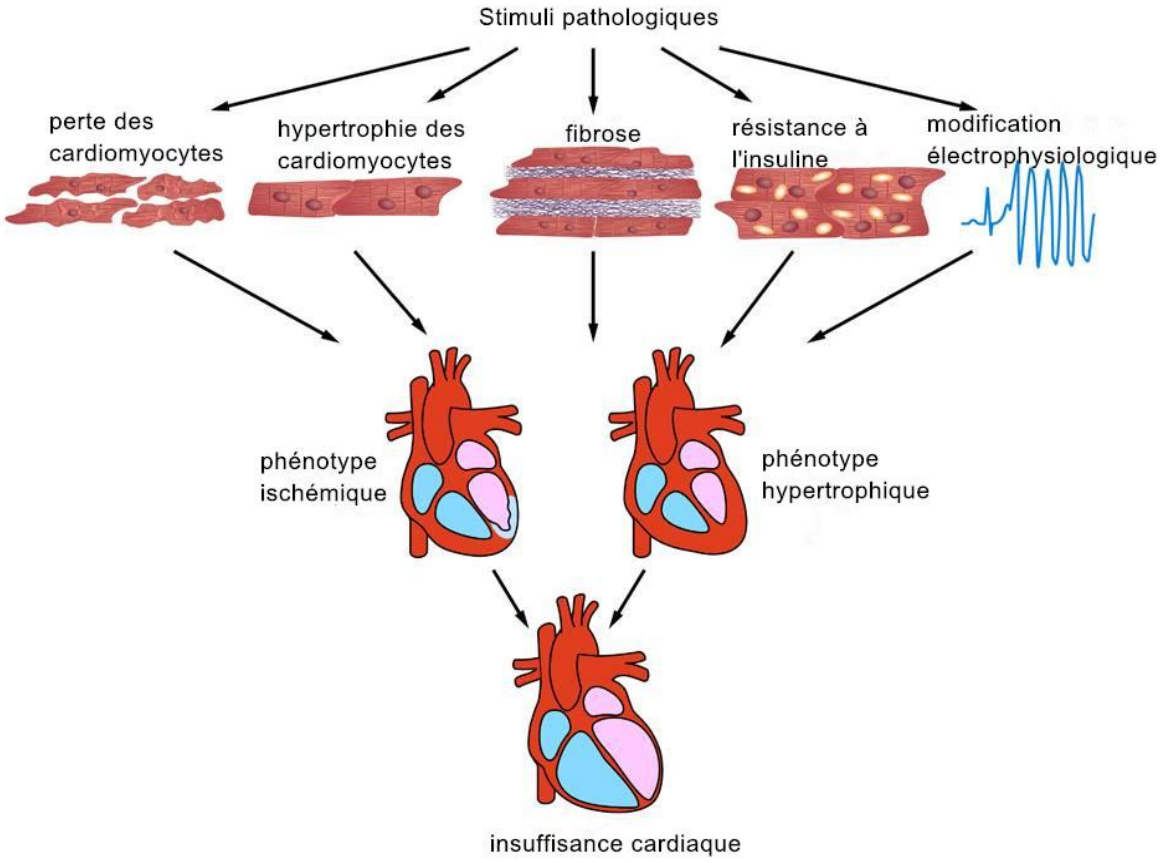


Figure 1:Les mécanismes du remodelage ventriculaire pathologique.

En réponse aux stimulations physiopathologiques telles que l'insulte ischémie/reperfusion et la surcharge mécanique, les multiples processus moléculaires et cellulaires contribuent au remodelage ventriculaire, qui consiste en (1) la perte des cardiomyocytes suite à l'apoptose, à la nécrose ou probablement à l'autophagie excessive ; (2) l'hypertrophie des cardiomyocytes, qui est une conséquence des facteurs déclenchants mécaniques mais aussi neuro-hormonaux ; (3) l'accumulation excessive de matrices extracellulaires conduisant à la fibrose ; (4) des désordres métaboliques, la résistance à l'insuline et la lipotoxicité ; et (5) la modification structurale et l'altération des processus de transport ionique responsables d'un phénotype pro-arythmique (d'après J. S. Burchfield[21], circulation 2013).

2.3 Le remodelage ventriculaire dans les cardiopathies ischémiques

Le concept du remodelage ventriculaire a été introduit en 1985 par J. Pfeffer[22] *et al.* qui ont découvert la dilatation du ventricule gauche (VG) et l'altération fonctionnelle du VG suite à la ligature coronaire chez les rats. Le remodelage post-infarctus est un processus complexe dans lequel l'extension de la zone infarcie entraîne une dilatation du VG ainsi qu'une surcharge de pression et de volume imposée aux cardiomyocytes dans la zone non-infarcie. L'extension et la localisation de l'infarctus sur le ventricule gauche (VG) déterminent directement l'ampleur du remodelage ventriculaire[2,23]. Dans la phase précoce post-infarctus, le remodelage ventriculaire, sous forme de dilatation de la cavité du VG, est bénéfique pour maintenir le débit systolique selon la loi de Starling ; mais à long terme, il est délétère[24] : il compromet la performance du myocarde éloigné de l'infarctus du myocarde (IDM), déjà en surcharge pour compenser la perte des unités contractiles dans la zone affectée.

La restauration précoce de la perfusion des artères coronaires responsables est cruciale pour limiter la taille de l'infarctus et préserver la performance cardiaque[21]. Les techniques interventionnelles de type angioplastie percutanée, avec la mise en place de stents nus et/ou actifs, ont significativement amélioré les résultats cliniques et ont permis de diminuer la mortalité dans la phase aigüe. Cependant, le remodelage du VG devient un processus inexorable, conséquence de la surcharge mécanique conduisant à la dilatation et à la dysfonction ventriculaire au cours des mois et/ou des années qui suivent l'IDM[25].

2.4 La cicatrisation post-infarctus et le remodelage ventriculaire : d'un point de vue temporel

Le remodelage du VG suite à l'IDM est divisé en plusieurs stades. L'occlusion de l'artère coronaire, qui donne lieu à une interruption de la perfusion artérielle, entraîne la mort cellulaire myocardique immédiate par nécrose, apoptose ou autophage[26]. Les cardiomyocytes morts libèrent des protéines intracellulaires dans la circulation et déclenchent la réponse inflammatoire. Les cellules inflammatoires, y compris les neutrophiles, les monocytes, les

macrophages et les lymphocytes, s'infiltrent dans le tissu lésé. Les cellules immunes éliminent les cardiomyocytes morts et préparent le terrain pour la cicatrisation. Par la suite, les fibroblastes cardiaques migrent, prolifèrent et sécrètent les protéines composant la matrice extracellulaire, telles que le collagène de type I, pour former une cicatrice fibrotique provisoire. Avec le temps, les collagènes s'interconnectent et deviennent résistants à la traction. Cette transformation est bénéfique pour éviter la rupture du cœur. Toujours est-il que le processus de remodelage du VG constitue une réponse au stress pariétal, provoquant une hypertrophie des cardiomyocytes dans la zone bordante et éloignée de l'IDM, un amincissement des parois ainsi qu'une dilatation progressive de la cavité du VG (**figure 2**).

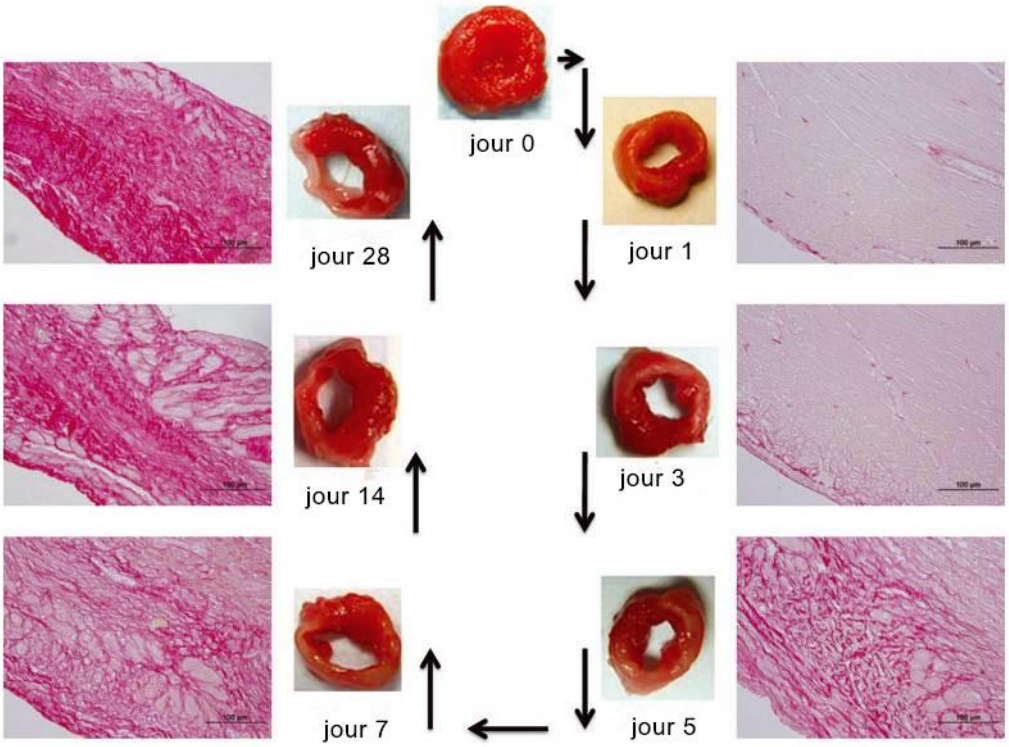


Figure 2:Le remodelage ventriculaire post-infarctus

L'évolution temporelle de l'amincissement de la paroi du VG et du dépôt des collagènes (coloration avec le rouge picrosirius) pendant 28 jours post-infarctus chez la souris (d'après M. L. Lindsey[27] *et al., Cardiovascular Therapeutics 2012*).

Comme démontré dans la **figure 3**, le remodelage ventriculaire post-IDM peut être divisé en trois phases superposées. Le renouvellement de la matrice extracellulaire joue un rôle essentiel dans le remodelage ventriculaire[27,28]. Les enzymes métalloprotéinases matricielles (MMPs) et les inhibiteurs tissulaires de la métalloprotéinase (TIMPs) sont impliqués dans ce processus.

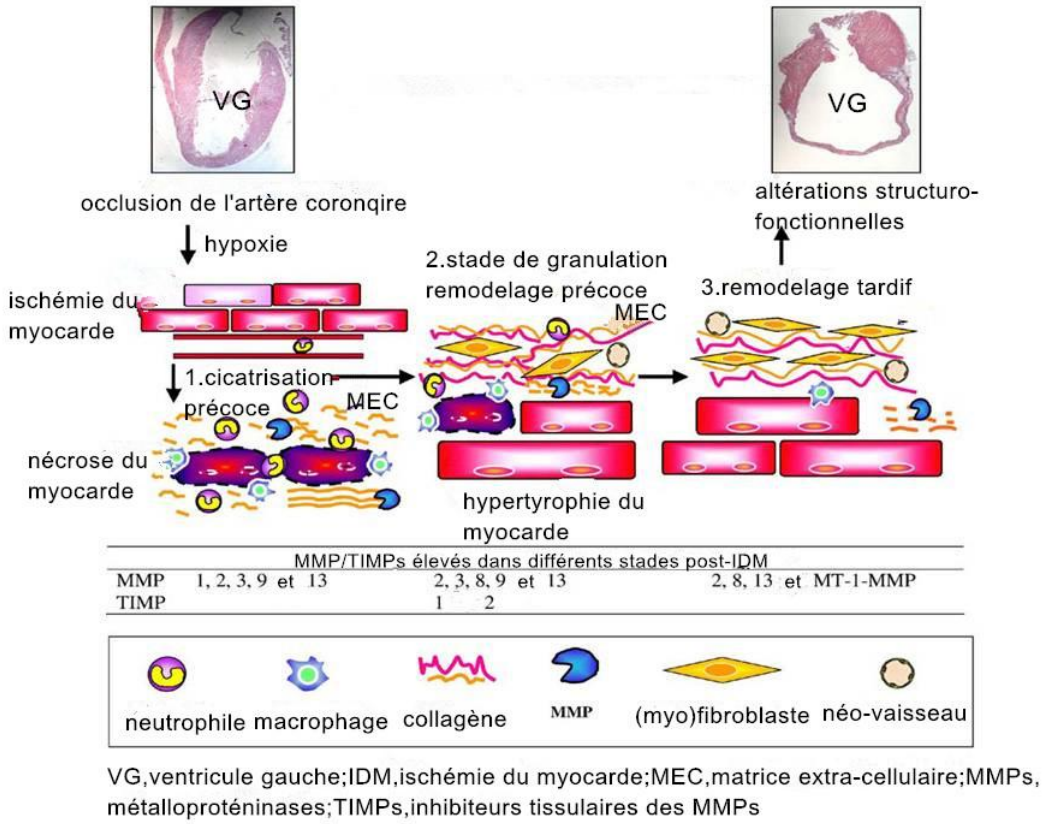


Figure 3:La cicatrisation post-IDM et le remodelage ventriculaire
(d'après D. Vanhoutte et M. Schellings[28], *Cardiovascular Research 2006*)

2.4.1 La phase d'inflammation ou de cicatrisation précoce (0-7 jours post-infarctus) : en raison d'un déséquilibre entre les MMPs et les TIMPs, les MMPs dégradent la matrice extracellulaire existante et permettent aux cellules inflammatoires, neutrophiles et macrophages, d'immigrer dans la zone infarcie pour éliminer les cardiomyocytes nécrosés. Par la suite, les cellules inflammatoires libèrent les MMPs, les cytokines, les facteurs de croissance et les facteurs angiogéniques.

2.4.2 La phase de granulation ou de remodelage précoce (7-21 jours post-IDM) : dans cette phase, il existe encore une phagocytose du myocarde nécrotique ; au même moment, les

myofibroblastes et les cellules endothéliales immigrent et prolifèrent dans la zone infarcie. Les myofibroblastes infiltrés déposent une matrice provisoire pour former le tissu de granulation et les cellules endothéliales forment de nouveaux vaisseaux sanguins. Mais les altérations architecturales complexes après l'IDM ne se limitent pas à la zone affectée. Elles touchent également la zone éloignée, là où les cardiomyocytes subissent un processus hypertrophique qui influence ultérieurement la performance cardiaque.

2.4.3 La phase de remodelage tardif (> 21 jours post-IDM) : le remodelage du VG se poursuit pendant plusieurs semaines. Les MMPs et les TIMPs continuent à avoir un impact important dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire. Dans cette phase, une dilatation progressive et une détérioration fonctionnelle du VG sont observées.

2.5 Le remodelage ventriculaire post-infarctus : d'un point de vue spatial

Comme indiqué ci-dessus, la taille et la localisation de l'infarctus du myocarde déterminent l'ampleur du remodelage ventriculaire, notamment le volume télé-systolique et, ultérieurement, le pronostic de l'IC. Les mécanismes biomécaniques sous-jacents de la dilatation cavitaire du VG avec le temps, après l'IDM, sont (1) l'étendue de l'infarctus dans la phase subaigüe[29], (2) l'extension non-ischémique de l'infarctus dans la zone adjacente ainsi que[30,31] (3) l'hypertrophie et la dilatation du myocarde dans la zone éloignée, lors de la phase chronique[32]. Dans ce contexte, il est intéressant d'analyser les différentes évolutions pathologiques qui ont lieu dans les trois zones géographiquement différenciables.

2.5.1 La zone infarcie

Comme déjà discuté plus haut, le processus de remodelage dans la zone infarcie (**figure 4**) est une série d'événements cellulaires et moléculaires complexes consistant en l'élaboration de cytokines, l'infiltration de cellules inflammatoires, la prolifération de cellules endothéliales, la formation puis la maturation de cicatrices fibrotiques et l'angiogenèse. La phase initiale inflammatoire après la reperfusion est caractérisée par la libération de cytokines/chimiokines et

l'infiltration de neutrophiles qui servent à éliminer les cardiomyocytes nécrosés et les débris cellulaires. Puis la phase proliférative prend le relais. Pendant cette phase, les myofibroblastes et les cellules endothéliales prolifèrent pour former du tissu de granulation avec de nouvelles matrices extracellulaires et des néo-vaisseaux. Les neutrophiles terminent leur travail en tant que « scavengers » et subissent les processus d'apoptose par la médiation des cytokines anti-inflammatoires, telles que les *transforming growth factors* (TGF)-β sécrétés par les macrophages[33]. Dans la phase terminale, les fibroblastes subissent l'apoptose, les néo-vaisseaux régressent, la matrice à la base des collagènes devient mature et la cicatrice solide se forme[34].

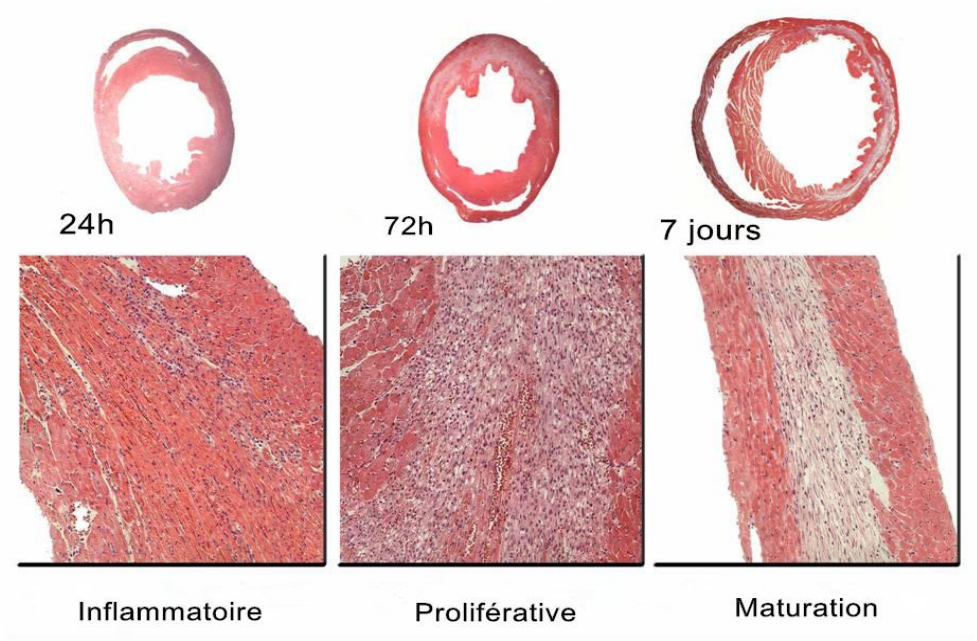


Figure 4:la cicatrisation et le remodelage post-infarctus.

La cicatrisation post-infarctus est étroitement liée au remodelage ventriculaire. La réparation intrinsèque peut être divisée en 3 phases qui se chevauchent. Dans la phase inflammatoire, des chimiokines et des cytokines sont induites et l'infiltration des leucocytes est observée dans l'infarctus. Les neutrophiles et les macrophages éliminent les cellules mortes et les débris matriciels. Pendant la phase de prolifération, les macrophages activés libèrent des cytokines et des facteurs de croissance ; les fibroblastes et les cellules endothéliales prolifèrent. Les myofibroblastes fabriquent les protéines de la matrice extracellulaire. Le tissu de granulation vascularisé se forme ensuite. La phase de maturation est caractérisée par l'apoptose des fibroblastes et la formation de la cicatrice riche en collagènes (d'après Frangogiannis *et al*[26]*, Pharmacological Research* 2009).

L'extension de l'infarctus dans la zone infarcie est peut-être le mécanisme sous-jacent le plus important du remodelage ventriculaire précoce. Il se caractérise par l'élargissement circonférentiel et l'amincissement radial de l'infarctus au cours des quelques jours ou semaines qui suivent un infarctus transmural. C'est un processus différent du phénomène du front d'onde, qui se traduit par l'extension de lésions nécrotiques myocardiques de l'endocardium vers l'épicardium dans les premières heures suivant la reperfusion[33]. L'extension de l'infarctus pendant la phase subaigüe étant l'un des principaux processus contribuant au remodelage ventriculaire précoce post-infarctus, la thérapie régénératrice et/ou la chirurgie réparatrice présentent de réels intérêts pour limiter l'étendue de l'infarctus. En effet, il a été rapporté qu'une simple plicature mécanique du tissu infarci par la suture en cordon de bourse permettait d'améliorer la performance cardiaque à l'échocardiographie dans un modèle d'IC post-infarctus chez le rat. Une technique chirurgicale alternative consiste à renforcer la propriété mécanique de la zone infarcie par un patch épicardique.

2.5.2 La zone bordant l'infarctus

La zone bordant l'infarctus est définie comme une zone interposée entre le tissu infarci et le myocarde sain. Cette zone n'est pas anatomiquement fixe mais plutôt évolutive car les études réalisées à l'aide de la technique micro-sonométrique ont montré qu'une partie de myocarde bordant l'infarctus et initialement viable est progressivement inclue dans la cicatrice mature. D'un point de vue mécanique, la zone bordante subit un stress anormal en raison de sa juxtaposition entre la zone contractile et une autre zone non contractile ; d'un point de vue biologique, la force de cisaillement qui s'applique aux cardiomyocytes dans la zone bordante induit le stress oxydatif et active la voie pro-inflammatoire[35]. La combinaison du stress oxydatif et nitrosatif conduit à l'apoptose de ces cardiomyocytes et déclenche la fibrose[33]. L'extension d'infarctus non ischémique a lieu par la suite.

L'extension de la réaction inflammatoire à la zone non infarcie entraîne une expansion de l'infiltration des leucocytes qui est responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et un remodelage délétère. L'hypothèse posée est que le mécanisme protecteur

endogène est déclenché dans la zone péri-infarcie pour limiter l'expansion de l'inflammation vers le myocarde viable[36]. En employant un modèle canin d'ischémie-reperfusion, Frangogiannis[37] *et al.* ont clairement démontré une localisation sélective de thrombospondine (TSP)-1, une protéine possédant un puissant effet angiostatique et activateur des TGF-β, dans la MEC et sur l'endothélium microvasculaire dans la zone bordante (**figure 5**). Des observations similaires ont été rapportées chez la souris. Après l'induction d'un infarctus, les souris déficientes en TSP-1 présentent une surexpression soutenue des chimiokines [*monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), INF-α-inducible protein 10 (IP-10)]* et des cytokines IL-1β, IL-6 et TGF-β[26], suggérant une réponse inflammatoire post-infarctus prolongée et amplifiée. De plus, la déficience du TSP-1 est associé à une densité accrue des macrophages et des myofibroblastes dans la zone bordante, suggérant une expansion du tissu de granulation au territoire non infarci.

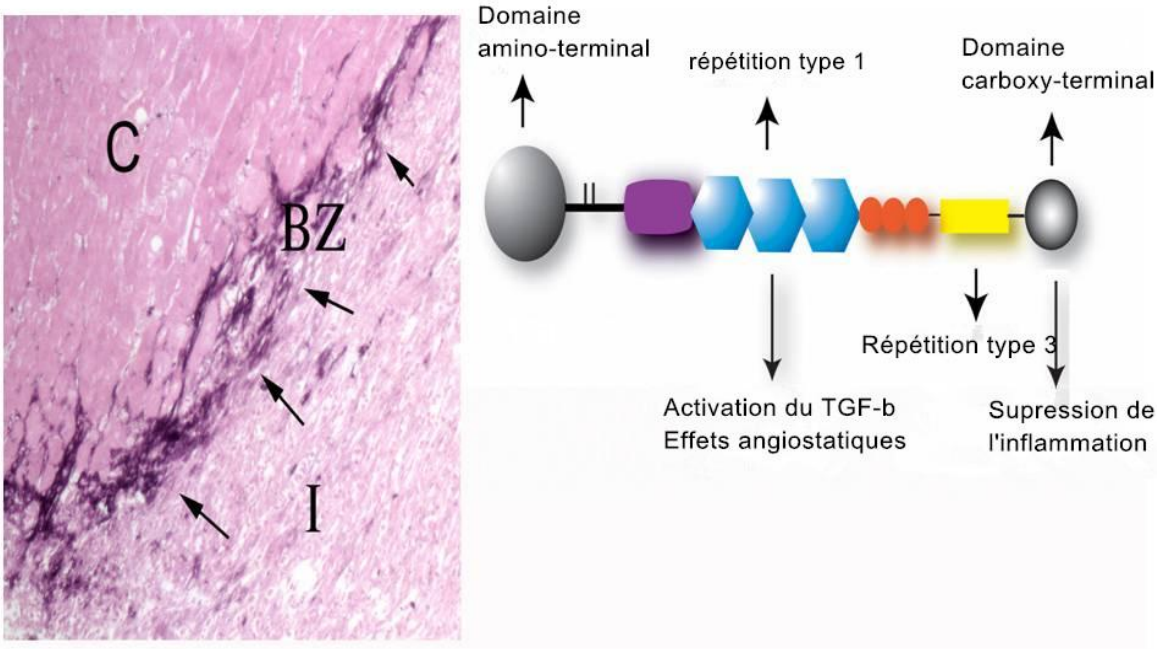


Figure 5:La zone bordante.

La zone bordant l'infarctus protège le myocarde dans la zone éloignée de la lésion réactionnelle inflammatoire. La coloration immunohistochimi du myocarde canin démontre un dépôt sélectif de protéine thrombospondine

(TSP)-1 (illustré par les flèches) dans la zone bordante (BZ). TSP-1 est un activateur clé de TGF-β. Il possède des effets anti-inflammatoires directs par la médiation de CD 47 et exerce un effet angiostatique. Donc, l'induction de TSP-1 dans la zone bordante constitue comme une barrière permettant d'inhiber l'expansion de l'inflammation à la zone éloignée. „I" signifie infarctus, „C" signifie le myocarde sain (d'après N. G. Frangogiannis[26], *Pharmacological Research* 2008).

Les cytokines/chimiokines pro-inflammatoires sont impliquées dans le processus d'expansion de l'infarctus non ischémique. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) d'angiotensine peuvent permettre de diminuer le stress pariétal et contrecarrer l'effet pro-inflammatoire de l'angiotensine, raison pour laquelle les IECs sont bénéfiques pour réduire l'étendue de l'infarctus dans la zone bordante[33]. Par contre, des études randomisées, à double aveugle[38], n'ont pas mis en évidence une efficacité significative des antagonistes de TNF-α dans le traitement de l'IC chronique. Il faut cependant souligner que les patients recrutés étaient porteurs de l'IC constituée mais pas ceux en phase de remodelage ventriculaire précoce post-infarctus.

2.5.3 La zone éloignée de l'infarctus

La zone éloignée de l'infarctus peut être définie comme la région située au-delà de la zone bordante, là où le myocarde ne souffre pas d'ischémie. La modification pathologique principale[33] est l'hypertrophie des cardiomyocytes, en réponse à la surcharge imposée par l'infarctus. L'ampleur de la réponse hypertrophique dépend (1) de la taille de l'infarctus, (2) du type d'infarctus (sous endocarde ou transmural), (3) de la localisation de l'infarctus (antérieure, inférieure, septale ou latérale), (4) du type de reperfusion (revascularisation complète, revascularisation partielle ou *no-reflow*), (5) de l'intensité de l'étendue de l'infarctus non ischémique et (6) d'autres facteurs tels que la pré-charge, la post-charge, les antécédents du patient (hypertension artérielle, diabète, etc.).

L'hypertrophie myocardique joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de l'IC. Il est généralement admis que la surcharge de pression provoque un épaississement des cardiomyocytes conduisant à une hypertrophie concentrique, tandis que la surcharge de volume

provoque un allongement des cardiomyocytes résultant en une hypertrophie excentrique. Le remodelage du VG post-infarctus est initialement du à une surcharge de volume. Il est donc caractérisé par une hypertrophie excentrique avec une manifestation de dilatation du VG. Ultérieurement, la dégradation de la MEC par les MMPs et la formation de nouveaux collagènes par les fibroblastes compliquent la réponse à la surcharge de volume et/ou de pression dans la zone éloignée. La dégradation de la MEC est responsable d'un glissement côte à côte des cardiomyocytes qui constitue vraisemblablement, lors de la phase de remodelage chronique post-infarctus, un autre mécanisme d'amincissement pariétal dans la zone éloignée. Le dépôt des collagènes immatures donne lieu à une fibrose interstitielle et à une dysfonction cardiaque.

D'un point de vue cellulaire, les stress mécaniques oxydatifs et nitrosatifs qui agressent les cardiomyocytes dans la zone éloignée conduisent à une réinduction du programme d'expression génétique qui est impliqué dans le développement fœtal. Des facteurs de transcription, *myocyte enhancer factor-2 (MEF-2),* GATA4 et myocardine[33], sont engagés à la fois dans le développement cardiaque prénatal et dans le processus hypertrophique en réponse aux stress. L'activation de MEF-2, réalisée grâce à la phosphorylation et la dissociation de *class II histone deacetylases (HDACS)*[39]*,* sert à supprimer la réexpression des gènes fœtaux. GATA4 est activé à l'aide de *GTPase Rho on rho-associated kinase (ROCK)*, puis est associé au facteur de transcription NFAT[40] (facteur nucléaire des lymphocytes T activés) afin d'activer le programme de croissance hypertrophique. L'approfondissement des connaissances sur les facteurs de transcription impliqués dans l'hypertrophie cardiaque laisse ouverte la possibilité que l'hypertrophie elle-même puisse être la cible thérapeutique de l'IC. Par exemple, les souris mutantes de *class II HDACS* et déficientes en phosphorylation régulatrice n'ont pas présenté d'hypertrophie ou d'expression des gènes fœtaux induite par la phenylephrine[41].

La division du cœur infarci en 3 zones, en fonction de la localisation de l'infarctus, a pour objectif de mieux comprendre la physiopathologie de l'IC et surtout de développer des traitements plus efficaces pour chaque zone ayant une pathogénèse différente (**tableau 2**).

Table 2:Les stratégies thérapeutiques et leurs cibles spécifiques dans la réparation cardiaque.
(d'après B. A. French *et al*[33], *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 2007*)

Zone	Tranche de temps	Traitement actuel	Thérapie à développer
Infarcie	Jours à semaines	Nitroglycérine IEC β-Bloquant	Inhibition des MMPs Restriction passive Thérapie cellulaire
Bordante	Semaines à mois	IEC β-Bloquant	Anti-apoptose Anti-cytokine Anti-inflammatoire Restriction passive
Eloignée	Mois à années	IEC β-Bloquant Inhibition d'aldostérone	Anti-hypertrophie Anti-cytokine Inhibition des MMPs

2.6 Les cytokines inflammatoires et le remodelage post-infarctus

La réponse inflammatoire et la sécrétion des cytokines font partie intégrante de la réponse de l'hôte après l'IDM. Les cytokines sont libérées par les cardiomyocytes de l'hôte et interviennent dans les processus de réparation et d'adaptation. Les cytokines, telles que le facteur nécrosant des tumeurs-α (TNF-α) et l'interleukine-6 (IL-6), sont élaborées rapidement après l'infarctus. Elles régularisent la survie ou la mort des cardiomyocytes et déclenchent la réponse inflammatoire cellulaire. A long terme, les cytokines servent d'intermédiaires dans les processus de réparation et de remodelage par le biais du renouvellement des collagènes, de l'angiogenèse et de la mobilisation des cellules souches. Les effets liés aux cytokines inflammatoires peuvent être favorables pour la cicatrisation et la restauration fonctionnelle, ou, au contraire, être délétères et conduire à la rupture du cœur, à la dilatation cardiaque chronique et à une évolution vers l'IC.

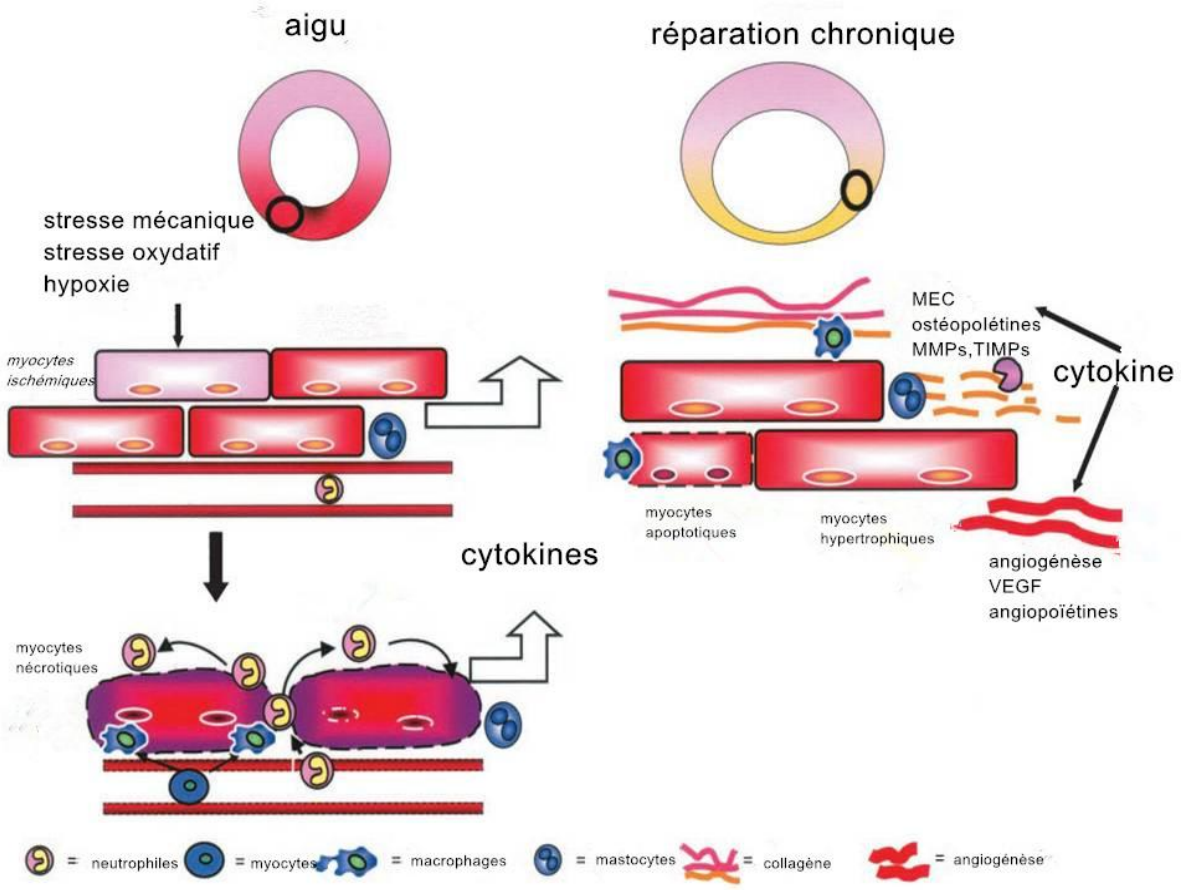


Figure 6:: L'induction des cytokines inflammatoires après l'IDM et leurs rôles dans le remodelage cardiaque aigu et chronique.

Les stress qui agressent les cardiomyocytes, y compris l'hypoxie dans le contexte d'ischémie, l'étirement mécanique et le stress oxydatif, induisent rapidement l'expression des cytokines inflammatoires telles que TNF-α et IL-6. Ces cytokines jouent un rôle important dans la mort (nécrose ou apoptose) des cardiomyocytes et dans la dysfonction contractile. Par la suite, la sécrétion des cytokines est amplifiée par la transmigration des macrophages et des neutrophiles. Dans la phase chronique post-infarctus, l'activation des MMPs et des TIMPs contribue à la dégradation des collagènes et de la réparation tissulaire. Les facteurs angiogéniques et la mobilisation des cellules progénitrices jouent également un rôle important dans les processus de cicatrisation. MEC, matrice extracellulaire ; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (d'après M. Nian[24], *Circulation Research* 2004).

2.6.1 Les déclencheurs de la production de cytokines post-infarctus

Les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1β et IL-6 ne sont pas constitutivement présentes dans le cœur normal[42]. La régularisation à la hausse de ces cytokines représente une

réponse intrinsèque au stress post-infarctus[43]. Dans les modèles de l'IDM chez les rongeurs, au cours des premières heures qui suivent l'induction d'IDM[44], les cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-1β et IL-6 sont exprimées jusqu'à 50 fois plus que la normale dans la zone infarcie et jusqu'à 15 fois plus dans la zone non-infarcie. L'expression de ces cytokines retourne à son niveau basal un jour après si l'IDM est de faible importance. En revanche, dans le cas où l'IDM est plus étendu, ou si la réponse inflammatoire de l'hôte est exubérante, soit la surexpression des cytokines va être soutenue, soit un deuxième front de cytokines surexprimées va apparaître, qui peut s'étendre dans la zone non-infarcie et correspondre au remodelage chronique[45]. Le stress mécanique et la lésion ischémique sont des facteurs déclenchants importants de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-6[24]. Le stimulus mécanique agit par le biais de mécano-capteurs tels que l'intégrine, le cytosquelette et les protéines sarcolemmals, puis est converti en signaux intracellulaires par trois voies de signalisation : *mitogen-activated protein kinase (MAPK), JAK-signal transducer and activator of transcription (STAT)* et la voie calcineurine-dépendante. Ces voies de signalisation activent les facteurs de transcription nucléaire en aval tels que NF-κB et AP-1, lesquels sont nécessaires pour l'induction d'expression de plusieurs gènes, y compris TNF-α et IL-6[46].

2.6.2 Le mécanisme de l'amplification des cytokines

Un des mécanismes d'auto-amplification des cytokines est dû à la boucle de feed-back positif engageant le facteur de transcription NF-κB[24]. La surexpression du TNF-α dans la zone infarcie peut induire une régularisation à la hausse de l'expression de TNF-α aux cardiomyocytes bordants. Irwin[45] *et al.* ont montré que le mARN de TNF-α était détectable dans la zone infarcie et la zone bordante 1 jour après l'IDM ; par contre, l'expression de TNF-α dans le myocarde sain controlatéral avait augmenté 35 jours après l'IDM. Nakamura[47] *et al*. ont réalisé une étude avec un modèle murin associant la transplantation cardiaque hétérotopique et la ligature coronaire chez le greffon. Ils ont montré que l'expression de TNF-α avait augmenté non seulement dans le greffon infarci mais aussi dans le cœur orthotopique sain et que la contractilité du cœur orthotopique était détériorée. Ces observations suggèrent que le TNF-α

peut activer une amplification d'expression dans la zone éloignée par un réseau « virtuel » dont le mécanisme reste imprécis.

De plus, l'amplification des cytokines s'effectue par le recrutement de cellules inflammatoires dans la région lésée. Peu de temps après l'IDM, les cytokines adhésives, telles que *monocyte chemoattractant protein*[48], une chimiokine puissante, sont induites dans les cardiomyocytes. Les chimiokines favorisent la transmigration des macrophages de la circulation sanguine qui sont sources des cytokines. En dehors des cellules mononucléaires telles que les macrophages et les neutrophiles, d'autres cellules inflammatoires jouent un rôle important dans l'inflammation précoce et la libération des cytokines après l'IDM. Les mastocytes d'origine médullaire s'accumulent aussi dans le myocarde après une ischémie-reperfusion. Elles libèrent des cytokines préformées et attirent également les cellules mononucléaires dans le tissu infarci.

2.6.3 Les effets pléiotrophiques des cytokines dans la réparation cardiaque

L'une des caractéristiques des cytokines engagées dans les processus d'endommagement et de réparation cardiaque est la pléiotropie fonctionnelle : une cytokine présente des effets biologiques multiples sur plusieurs types de cellules et plusieurs cytokines exercent leurs fonctions similaires et/ou contradictoires sur un certain type de cellules. Les effets des cytokines multifonctionnelles, souvent contradictoires et qui se chevauchent également, compliquent le rôle de celles-ci dans les processus d'endommagement et de réparation post-IDM.

2.6.4 Le TNF-α

Les effets du TNF-α incluent : (1) la détérioration de la contractilité cardiaque[49], (2) le développement de l'apoptose des cardiomyocytes[50], (3) la stimulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des molécules adhésives chez les leucocytes et les cellules endothéliales[51] et (4) la régularisation du métabolisme des matrices extracellulaires afin de réduire la synthèse des collagènes et de renforcer l'activité des MMPs

chez les fibroblastes[51]. Malgré des recherches extensives, la signification de ces divers effets sur le myocarde infarci reste insuffisamment connue. Sun [52]*et al.* ont montré que les souris déficientes en TNF-α étaient protégées de la rupture cardiaque et de la dysfonction contractile post-IDM. Elles ont présenté une réaction inflammatoire diminuée et une activité atténuée des MMPs par rapport aux souris sauvages. Pourtant, plusieurs études[53,54] ont montré des résultats contradictoires concernant l'effet bénéfique des antagonistes de TNF-α dans le traitement de l'IDM. D'une part, TNF-α s'implique dans l'extension de l'infarctus ; d'autre part, la neutralisation de TNF-α avec le récepteur soluble a été associée à un risque accru de la rupture cardiaque et du remodelage délétère[55]. Le TNF-α exerce sa fonction par l'intermédiaire de ses récepteurs TNFR1 et TNFR2. L'hypothèse posée est que les effets par l'intermédiaire de TNFR1 sont délétères (induction de la dysfonction contractile par ex.) tandis que les effets par l'intermédiaire de TNFR2 sont protecteurs (atténuation du remodelage ventriculaire[56] par ex.). Ces constatations contradictoires soulignent les effets compliqués et pléiotrophiques des cytokines dans les processus biologiques.

2.6.5 La famille de l'IL-1

La famille de l'IL-1 est composée de trois membres : IL-1α, IL-1β et l'antagoniste du récepteur d'IL-1(IL-1Ra)[57]. IL-1α et IL-1β sont capables d'induire l'expression des autres cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et molécules adhésives. La concentration plasmatique d'IL-1β est élevée chez les patients avec IDM aigü[58]. La transfection du gène codant pour l'IL-1Ra aux rats subissant une ischémie-reperfusion est associée à une réduction de la taille de l'infarctus, à une réduction de l'apoptose et à une atténuation de la réponse inflammatoire, suggérant le rôle délétère de l'IL-1 dans l'ischémie cardiaque[59]. Par contre, une autre étude a montré que la neutralisation de l'IL-1β dans la phase aigüe post-infarctus donnait lieu à une fréquence accrue de la rupture cardiaque, suggérant le rôle protecteur de l'IL-1[60]. La signalisation de l'Il-1 est entièrement dépendante de son récepteur de type I (IL-1RI). Par conséquent, la souris dépourvue d'IL-1RI-/- est un bon modèle animal simulant l'interruption de la signalisation d'IL-1. Les souris IL-1RI-/- présentent une diminution de l'infiltration des

cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages) ainsi qu'une réduction de l'expression des cytokines et des chimiokines dans la zone infarcie[61]. Ces souris présentent également une diminution des dépôts de collagène et de l'expression des MMPs dans la zone péri-infarcie. Cependant, la taille de l'infarctus est comparable à celle chez les souris sauvages, suggérant que les effets bénéfiques du gène IL-1RI ne sont pas ressentis sur l'apoptose des cardiomyocytes. IL-1β stimule la synthèse des MMPs chez les souris sauvages mais pas chez les souris IL-1RI-/-. Ces constatations suggèrent que la signalisation d'IL-1 est essentielle pour l'activation des voies pro-inflammatoires et pro-fibrosantes dans les processus de cicatrisation et de remodelage post-infarctus[61].

2.6.6 La famille de l'IL-6

La famille de l'IL-6 est constituée de plusieurs cytokines proches structurellement, avec des effets biologiques qui se chevauchent, y compris IL-6, IL-11, *leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin-M, cardiotrophin-1(CT-1), ciliary neurotrophic factor (CNTF) et neurotrophion-1/B-cell stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)*[26]. La synthèse d'Il-6 est rapidement induite dans les cellules mononucléaires et dans les cardiomyocytes souffrant d'ischémie[62]. CT-1 est produit par les fibroblastes et présente une longue durée d'expression après l'IDM. L'administration du CT-1 aux rats ayant subi une ischémie-reperfusion est associée à une diminution de la taille de l'infarctus et de l'apoptose des cardiomyocytes[63]. La surexpression du CT-1 prolongée dans le myocarde est liée aux processus fibrosants, lesquels favorisent la prolifération des fibroblastes[64]. Le LIF et l'oncostatine M sont induits dans la phase inflammatoire. Ces cytokines jouent un rôle important dans le processus d'hypertrophie des cardiomyocytes. Même si le rôle du LIF endogène dans les processus de réparation et du remodelage reste inconnu, la thérapie génique avec LIF cADN permet de réduire la mort des cardiomyocytes, de favoriser l'angiogenèse et de renforcer le recrutement de cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire[65]. Les souris dépourvues d'IL-6 présentent un retard important au niveau de la cicatrisation cutanée, suggérant le rôle essentiel de l'IL-6 dans la réparation tissulaire[66]. Les cytokines de la famille de l'IL-6 exercent leurs effets cellulaires afin

d'activer la voie de signalisation JAK/STAT.

2.6.7 L'IL-10

L'IL-10 est principalement fabriquée par les lymphocytes Th2 activés. Elle possède une propriété anti-inflammatoire puissante[67]. Parmi les cellules influencées par l'IL-10, les monocytes-macrophages sont spécialement touchés en termes de fonction, de morphologie et de phénotype. IL-10 inhibe la production d'IL-1α, IL-1β, TNF-α, Il-6 et IL-8. Mis à part la suppression de l'inflammation, IL-10 joue un rôle essentiel dans le remodelage des matrices extracellulaires en renforçant la synthèse de TIMPs[68].

Dans un modèle canin[69] d'ischémie-reperfusion, l'expression d'IL-10 était élevée à partir de la 5^{e} heure et le pic se situait au 4^{e}-5^{e} jour après la reperfusion. L'induction d'IL-10 est associée à une diminution de l'expression de l'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire. Le rôle de l'Il-10 dans la résolution de l'inflammation post-infarctus reste controversé. Yang[70] *et al.* ont montré que les souris dépourvues d'IL-10 présentaient une réponse inflammatoire amplifiée avec un recrutement renforcé de neutrophiles, une concentration plasmatique élevée de TNF-α et une expression tissulaire accrue d'ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*). Une autre étude a en revanche montré une mortalité comparable entre les souris IL-10 -/- et les souris sauvages subissant un IDM[71]. L'interruption du gène IL-10 ne modifie pas les processus de fibrose et du remodelage dilatateur. Ces observations suggèrent que la signalisation de l'IL-10 joue un rôle non crucial dans la suppression et la résolution de l'inflammation ainsi que dans le processus de fibrose post-infarctus[71]. Cela est peut-être dû à ses effets anti-inflammatoires relativement sélectifs au regard des cellules et des stimuli, alors que la résolution de l'inflammation post-infarctus engage plusieurs mécanismes régulateurs qui se chevauchent et qui contrôlent les voies pro-inflammatoires dans les processus de réparation post-infarctus.

2.6.8 Le TGF-β

Le TGF-β est une cytokine aux effets pléiotropes pouvant réguler la prolifération, la

différenciation et l'apoptose cellulaire et qui module également la réponse immunitaire. Chez les mammifères, le TGF-β existe sous trois isoformes (TGF-β1, 2 et 3), codés par 3 gènes distincts[72]. TGF-β1 est l'isoforme dominante et presque omniprésente tandis que les autres isoformes s'expriment dans un spectre limité de cellules et de tissus. Le TGF-β est fabriqué par plusieurs types de cellules en tant que complexe latent qui est incapable de s'associer à ses récepteurs. Le complexe latent est composé de deux parties : TGF-β fonctionnel et *TGF-β latency associated peptide (LAP)*[73]. L'association de TGF-β et LAP inhibe son activité biologique et la dissociation de deux composants est suffisante pour activer le TGF-β. Plusieurs molécules sont activatrices du TGF-β tels que les protéases[74] (plasmine, MMP-2 et MMP-9) et le thrombospondine-1 (TSP-1)[75], qui rompt l'interaction non-covalente entre le TGF-β et LAP. En raison de ses effets anti-inflammatoires et pro-fibrosants, le TGF-β activé joue un rôle essentiel dans la réparation cardiaque par le biais de la transition de l'inflammation vers la fibrose.

Le TGF-β est augmenté significativement dans les modèles animaux de l'IDM[76]. Les isoformes du TGF-β sont également très présentes après l'IDM : le TGF-β1 et le TGF-β2 sont induits précocement tandis que le TGF-β3 présente une surexpression retardée et prolongée[77]. L'expression de TGF-β dans le cœur infarci est grandement atténuée par les IECs et les inhibiteurs de l'angiotensine, suggérant que la signalisation de l'angiotensine II est essentielle pour stimuler la synthèse de TGF-β dans l'infarctus[78].

Le TGF-β est un médiateur clé dans la transition de la phase inflammatoire vers la phase fibrotique[79]. Il supprime l'expression des cytokines et des chimiokines en stimulant les cellules mononucléaires et les cellules endothéliales. Le TGF-β inhibe la prolifération de la plupart des cellules. Il stimule les fibroblastes pour synthétiser plusieurs protéines extracellulaires telles que les collagènes, la fibronectine, la ténascine et des protéoglycanes[80]. De plus, il inhibe la dégradation des matrices extracellulaires ; l'expression des protéinases (collagénases, activateur du plasminogène) est ainsi diminuée et la synthèse des inhibiteurs des protéinases (TIMPs) favorisée[81].

Après l'activation, TGF-β activé se lie au récepteur type II (TβRII) situé dans la membrane cellulaire. Le complexe interagit avec le récepteur du TGF-β type I (TβRI) et transphosphoryle le domaine cytoplasmique du TβRI. La phosphorylation du TβRI propage la signalisation

intracellulaire en aval par les protéines Smad[82]. En raison des effets pléiotrophiques du TGF-β, l'exploration des voies de signalisation pour exercer ses fonctions nous permet d'identifier des cibles thérapeutiques. Des évidences montrent que Smad3 joue un rôle important dans le processus de fibrose[83]. De plus, certaines thèses soutiennent que l,,effet anti-inflammatoire est probablement Smad3-dépendant[84]. Les rats déficients en Smad3 présentent une réduction du pic de l'expression des cytokines et une réduction du recrutement des neutrophiles dans le myocarde infarci mais ils présentent une résorption de l'inflammation en temps opportun[84]. Même si la densité des myofibroblastes est plus élevée chez les rats déficients en Smad3, la distribution des collagènes et le marqueur du remodelage interstitiel actif Ténascine-C sont significativement réduits dans la zone péri-infarcie et dans le myocarde non-infarci[85]. La diminution de la fibrose dans le myocarde non infarci est associée à une réduction du remodelage de type dilatation[86]. Pourtant, les tailles d'infarctus chez les rats déficients et les rats sauvages sont comparables.

2.6.9 Les approches anti-inflammatoires sont-elles efficaces pour réduire la lésion myocardique post-infarctus ?

Bien qu'il ait été prouvé que, dans le cœur infarci, les leucocytes infiltrés et les médiateurs inflammatoires peuvent induire des effets délétères sur le myocarde viable, la stratégie thérapeutique visant à supprimer la réaction inflammatoire est généralement vouée à l'échec. L'expérience catastrophique de l'essai avec le méthyprednisolone[87] souligne la nécessité de mieux comprendre les événements cellulaires et moléculaires associés à la réponse inflammatoire pour obtenir une suppression efficace des processus délétères sans perturber la cicatrisation et la réparation cardiaque intrinsèque. Les résultats décevants de l'essai avec anti-CD18 amènent à des critiques concernant l'utilité des stratégies visant la cascade inflammatoire dans l'IDM[88]. Tout d'abord, les effets délétères de l'inflammation sur les cardiomyocytes sont surestimés. Même si des études expérimentales ont montré que la taille de l'infarctus était significativement réduite grâce aux inhibiteurs de certains médiateurs inflammatoires, ces résultats ne représentent pas des expériences collectives. Les études avec

des résultats « négatifs » ne sont peut-être pas publiées. De plus, la cascade inflammatoire est constituée de médiateurs moléculaires avec des effets pléiotrophiques et avec une variabilité temporelle et spatiale. Certaines cytokines peuvent être, à juste titre, une cible thérapeutique compte tenu de leurs effets délétères dans la phase précoce post-infarctus mais elles peuvent elles-mêmes être des régulateurs essentiels dans le processus de cicatrisation cardiaque. Enfin, la complexité des scénarios cliniques ne peut pas être entièrement simulée dans les études expérimentales. Les facteurs variables tels que l'âge, le sexe, la présence de comorbidité, le temps de revascularisation ainsi que la prédisposition génétique influencent grandement la réponse individuelle de l'intervention thérapeutique. Des études ont montré que le remodelage post-infarctus était renforcé grâce à une inflammation diminuée, à une formation de granulation tissulaire retardée et à un dépôt réduit des collagènes[89]. Par contre, les animaux jeunes présentent une inflammation post-infarctus forte et une cicatrice de collagène épaisse. Malheureusement, la plupart des études expérimentales sont réalisées chez les animaux jeunes avec une pathologie myocardique différente de celle des sujets âgés.

2.6.10 La modulation de la réponse inflammatoire et le remodelage cardiaque

Même si l'intervention visant à réduire l'inflammation post-infarctus ne peut réduire la mort des cardiomyocytes, la modulation des processus de réparation ayant pour objectif d'optimiser les propriétés mécaniques et fonctionnelles du cœur infarci reste un sujet intéressant[90]. Les études expérimentales montrent que certaines stratégies modulant l'inflammation sont bénéfiques pour la réduction du remodelage cardiaque, comme l'inhibition de signalisation des chimiokines, la modulation des matrices extracellulaires et le renforcement des processus endogènes du confinement et de la réduction de l'inflammation. Une cicatrisation efficace post-infarctus dépend d'une réponse cellulaire bien coordonnée de l'induction et de la suppression des médiateurs spécifiques d'une manière qui soit limitée localement. Les caractéristiques topographiques et temporelles doivent donc être prises en compte dans l'intervention visant les médiateurs inflammatoire post-infarctus. Une stratégie visant à réduire la formation des collagènes dans le cœur infarci peut par exemple entraîner une diminution de

la fibrose interstitielle dans la région non-infarcie mais elle peut également conduire à un remodelage accru et à une dilatation ventriculaire en supprimant le dépôt des collagènes au cœur de l'infarctus[26].

2.7 La régénération cardiaque est-elle une stratégie thérapeutique réaliste ?

Les cardiomyocytes ont longtemps été considérés comme des cellules différenciées, incapables de se régénérer pour remplacer le myocarde lésé. Ce concept a été contesté par des études récentes suggérant qu'une partie des cardiomyocytes retournent dans le cycle cellulaire et que la régénération cardiaque peut avoir lieu par le recrutement de cellules souches résidentes et/ou circulantes[91,92]. Il a été démontré par la technologie du carbone datant qu'environ 1 % des cardiomyocytes sont renouvelés chaque année[4]. La régénération cardiaque post-infarctus reste un sujet controversé. Dans le cadre d'études fondamentales comme cliniques, le concept de réparation du myocarde lésé par des cellules engagées a permis d'explorer les effets et les mécanismes de la thérapie cellulaire[93,94]. La régénération cardiaque a d'abord été menée avec les myoblastes squelettiques autologues. Il a été démontré que la différenciation en cardiomyocytes était peu probable et que les myoblastes restaient fonctionnellement isolés de l'hôte[95]. Plusieurs scientifiques ont étudié de façon indépendante le potentiel des cellules dérivées de la moelle osseuse à promouvoir la régénération cardiaque. Orlic[96] *et al.* ont trouvé que les cellules souches hématopoïétiques pouvaient se transdifférencier en cardiomyocytes et améliorer la fonction cardiaque après leur transplantation dans les cœurs infarcis. Malheureusement, leurs résultats n'étaient pas reproductibles par d'autres, suggérant que l'angiogenèse et la cardiogénèse sont des processus compliqués nécessitant des conditions précises, des facteurs de croissance et probablement des phénotypes spécifiques des cellules progénitrices[97,98].

Récemment, les premières études expérimentales ont trouvé des effets bénéfiques chez les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) en matière de réparation cardiaque post-infarctus[99]. Les résultats préliminaires encourageants ont conduit rapidement aux études cliniques avec des cellules dérivées médullaires pour traiter l'IC post-infarctus. Jusqu'en 2013,

la thérapie cellulaire cardiaque a été appliquée à plus de 3 000 patients dans le monde entier[4]. Les résultats obtenus sont plutôt décevants par rapport à l'objectif initial avec une amélioration modérée, transitoire et inconsistante des symptômes, de la fonction et de la géométrie du ventriculaire gauche (VG). Néanmoins, les études cliniques de la « première génération » étaient informatives en démontrant que la thérapie cellulaire était réalisable et sans danger. Les effets bénéfiques semblent être liés aux effets paracrines avec la libération des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance. Ils activent les mécanismes de la réparation intrinsèque, inhibent l'apoptose des cardiomyocytes et la fibrose et améliorent la contractilité.

Il est raisonnable de prendre en considération quelques points importants pour anticiper la thérapie cellulaire dans le traitement des cardiopathies ischémiques. Premièrement, l'IDM aigu, l'IDM chronique et l'IC chronique ischémique sont trois pathologies différentes en terme de microenvironnement cellulaire, vasculaire et chimique au sein de l'infarctus. Il est nécessaire d'optimiser les conditions locales au moment de l'administration des cellules. Deuxièmement, l'angiogenèse et la vasculogénèse sont capitales pour améliorer le transport de l'oxygène et du nutriment pour le myocarde souffrant de l'ischémie chronique mais aussi pour les cellules implantées. Troisièmement, les cytokines et les facteurs de croissance paracrines agissent non seulement sur les composants cellulaires cardiaques de l'hôte mais également sur les cellules administrées elles-mêmes[4].

2.7.1 Les types de cellules souches

Les cellules souches sont définies comme ayant des caractéristiques spécifiques : elles sont indifférenciées, auto-renouvelables, clonogéniques et multipotentes. Plusieurs types de cellules souches ont été utilisés pour le traitement des cardiopathies ischémiques. En fonction de leur origine anatomique, les cellules souches utilisées dans la thérapie cellulaire cardiaque (**figures 7, 8**) sont catégorisées en (1) cellules souches embryonnaires, (2) myoblastes squelettiques, (3) cellules souches dérivées médullaires, (4) cellules souches mésenchymateuses dérivées de tissus adipeux, (5) cellules souches cardiaques et (6) cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).

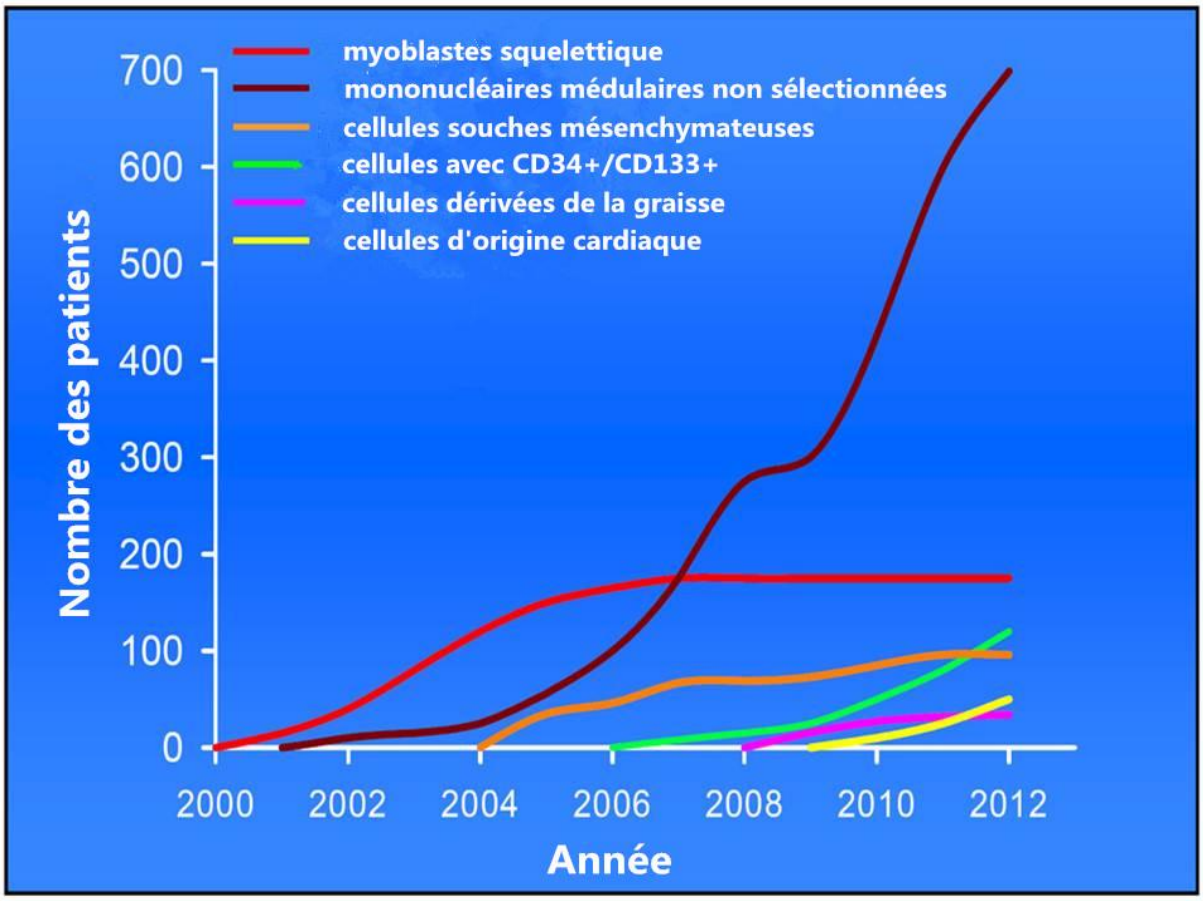


Figure 7:Les types de cellules souches utilisées dans les études cliniques.

Nombre de patients avec des cardiopathies traitées avec 6 principaux types de cellules entre 2000 et 2012 (d'après Sanganalmath[5] *et al.*, *Circulation Research* 2014).

2.7.2 Les cellules souches embryonnaires (CSEs)

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules totipotentes qui possèdent la capacité de se différencier en cellules dérivées de trois couches germinatives : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Les CSEs se trouvent dans la masse cellulaire interne au stade blastocyste de l'embryon de 3 à 5 jours. Les CSEs ont été initialement isolées chez les murins en 1981 par Evans, Kaufman et Martin qui ont découvert leur capacité à se proliférer *in vitro* dans une période indéfinie tout en maintenant leur pluripotentialité[4]. Les CSEs ont montré leur potentiel à se différencier en cellules fonctionnelles cardiaques, neuronales et pancréatiques. Malgré leur potentialité régénérative énorme, l'application des CSEs chez les êtres humains est un sujet

controversé sur le plan de l'éthique médicale ainsi que sur le plan biologique (tumorigenèse et rejet). Jusqu'à présent, aucune étude clinique utilisant les CSEs pour la réparation cardiaque n'a été publiée.

2.7.3 Les cellules souches pluripotentes inductibles (iPSCs)

En 2006, Takahashi et Yamanaka[100] ont réussi à créer des iPSCs à partir de fibroblastes d'origine murine adulte à l'aide de facteurs de transcription (OCT 3/4, Sox2, c-Myc et Klf4). Les iPSCs expriment les marqueurs de surface et montrent une morphologie et des propriétés de croissance similaires aux CSEs. Les cardiomyocytes dérivés des iPSCs possèdent des propriétés typiques des cellules cardiaques telles que le battement spontané, la contractilité et le couplage excitation-contraction[101]. Bien que les iPSCs constituent un grand espoir pour la régénération cardiaque, les facteurs de transcription utilisés pour induire les iPSCs sont connus pour leur caractéristiques oncogéniques pouvant donner lieu à des tératomes. D'autres problèmes liés aux iPSCs sont la génération peu efficace et les caractéristiques biologiques variables d'une ligne à une autre[102].

2.7.4 Les myoblastes squelettiques

Le muscle squelettique possède une capacité régénérative importante grâce aux myoblastes squelettiques dérivés des cellules satellites[103]. Les myoblastes squelettiques restent dans un état inactif jusqu'à ce que le muscle soit lésé. Quand une lésion musculaire se produit, les myoblastes prolifèrent rapidement et interagissent avec les myocytes lésés pour rétablir la continuité de la fibre musculaire[104]. La capacité de prolifération et de différentiation des myoblastes en fibre musculaire a inspiré les chercheurs pour utiliser des cellules satellites dans la réparation du cœur lésé.

En raison de la facilité d'obtention de cellules par biopsie musculaire, la rapidité d'expansion *in vitro* et la résistance à la condition hypoxique et ischémique[105], les myoblastes squelettiques sont les premières cellules testées dans les études expérimentales et cliniques[106]. Par contre, les

myocytes squelettiques ne sont pas capables de générer des contractions continues, répétitives, de haute fréquence et synchrones qui sont la caractéristique clé des cardiomyocytes. Le désavantage des myoblastes squelettiques dans la réparation cardiaque est qu'ils restent dissociés électriquement et mécaniquement des cardiomyocytes de l'hôte[4].

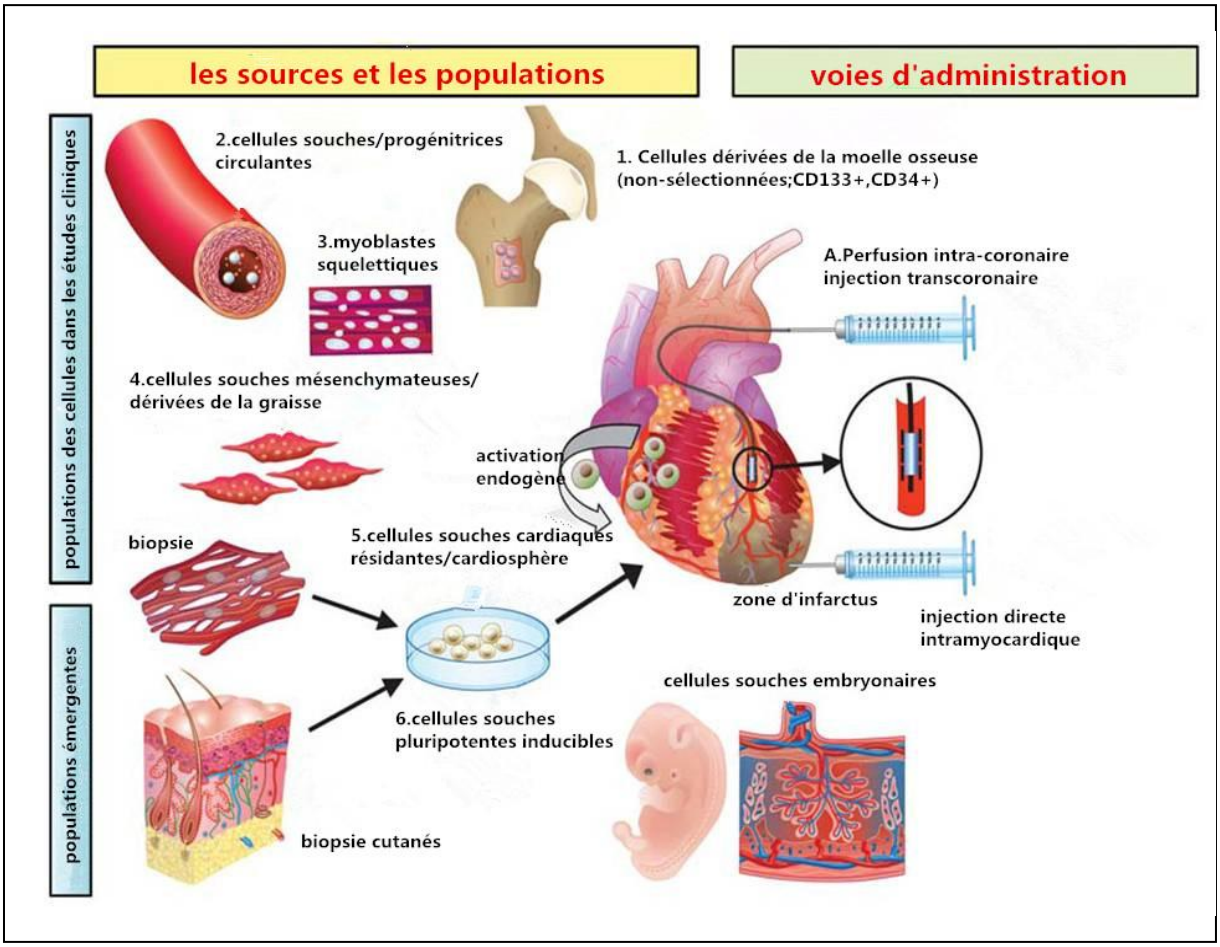


Figure 8: Les types de cellules et les voies d'administration dans la thérapie cellulaire cardiaque.
Les cellules impliquées dans les études cliniques comprennent : (1) les cellules mononucléaires dérivées de la moelle osseuse, (2) les cellules souches/progénitrices circulantes, (3) les myoblastes squelettiques, (4) les cellules souches mésenchymateuses, (5) les cellules souches/progénitrices cardiaques résidentes et (6) les cellules souches pluripotentes inductibles. Les voies d'administration les plus utilisées sont la perfusion intracoronaire et l'injection intramyocardique (d'après J. Tongers[107] *et al., European Heart Journal* 2011).

2.7.5 Les cellules souches dérivées de la moelle osseuse

La moelle osseuse contient différents types de cellules souches hématopoïétiques (CSHs) et

non-hématopoïétiques qui possèdent la potentialité de se différencier en phénotypes divers. Les cellules souches indifférenciées peuvent être isolées des cellules différenciées par centrifugation en gradient de densité. Le produit final obtenu par centrifugation est constitué par les cellules mononucléaires de la moelle osseuse, qui contiennent 2-4 % de CSHs/cellules progénitrices endothéliales (CPE) et environ 0,01 % de cellules souches mésenchymateuses (CSMs)[108]. Chez l'homme, les CSHs expriment les marqueurs de surface CD31, CD34, CD45, CD133 et sont négatives pour CD38 et Lin[109,110]. Par contre, les CSMs n'expriment pas de marqueurs de lignée hématopoïétique (CD31-, CD34-, CD45-, CD133-) mais elles sont positives pour CD90 et CD105. Les CSMs sont aussi négatives pour HLA-DR, raison pour laquelle elles échappent à la reconnaissance immunitaire[108,111].

Normalement, les cellules mononucléaires de la moelle osseuse ne se différencient pas en lignée cardiaque. Les CSHs sont à l'origine des cellules endothéliales et des cellules composantes des lignées hématopoïétiques[112]. Les CSMs génèrent les adipocytes, les chondrocytes et les ostéocytes. Cependant, il a été montré que dans des conditions micro-environnementales spécifiques, les CSHs pouvaient être transdifférenciées *in vivo* en phénotypes très divers, y compris en muscles squelettiques, neurones, hépatocytes et éventuellement en cardiomyocytes[113]. Pourtant, la potentialité des CSMs à se transdifférencier en cardiomyocytes reste controversée.

Jusqu'à présent, la plupart des études cliniques de la thérapie cellulaire cardiaque ont utilisé des cellules d'origine médullaire. Les cellules souches résidant dans la moelle osseuse ne sont pas suffisantes pour une réparation efficace des organes. L'aspiration de la moelle osseuse, l'isolement, la sélection du phénotype spécifique et l'expansion *in vitro* sont nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Contrairement aux CSHs, les CSMs sont privées de complexe majeur d'histocompatibilité et échappent donc à la détection immunitaire et au rejet. Les CSMs gardent une fonction physiologique quand elles sont conservées au froid. Les CSMs peuvent par conséquent être utilisées en tant que intégration allogénique.

2.7.6 Les cellules souches cardiaques (CSCs)

En 2003, Anversa[114] *et coll.* ont identifié pour la première fois dans le myocarde les cellules souches cardiaques qui génèrent les cardiomyocytes : les myocytes lisses et les cellules endothéliales[115,116]. Les CSCs sont caractérisées par la présence des antigènes de surface c-kit, Sca-1 et MDR1. Elles n'expriment pas les marqueurs de surface CD31, CD34, CD133 et KDR. Les CSCs se situent dans les niches de cellules souches réparties dans la totalité du cœur, avec une localisation prédominante à l'apex du VG et dans le tissu atrial. Les CSCs participent au renouvellement cardiaque par la formation de myocytes nouveaux et de capillaires. Malgré la potentialité régénérative des CSCs, le cœur apparaît ne pas pouvoir se défendre de façon adéquate contre les lésions ischémiques et non-ischémiques. Quelques hypothèses sont posées pour expliquer la capacité limite de la réparation endogène : la lésion ischémique touche les CSCs comme les cardiomyocytes natifs et les cellules endothéliales[117] ; le nombre des CSCs c-kit+ diminue avec l'âge[118] ; les CSCs possèdent une capacité limitée de migration dans la zone infarcie[119].

Dans un modèle canin de transplantation cardiaque orthotopique, il a été montré que les CSCs isolées et explantées à partir du cœur du donneur généraient des cardiomyocytes immunocompatibles (**figure 9**) et favorisaient la néovascularisation après avoir été injectées en intracoronaire dans le cœur transplanté[120]. Ce nouveau modèle d'exploration de la thérapie cellulaire démontre la faisabilité de régénérer le myocarde sur une allogreffe. Cette stratégie peut être utilisée comme un traitement antirejet du cœur transplanté. L'injection à répétition des CSCs autologues peut créer un chimérisme contenant les cardiomyocytes du greffon et les cellules différenciées d'origine des CSCs afin de réduire l'incidence et le retentissement du rejet.

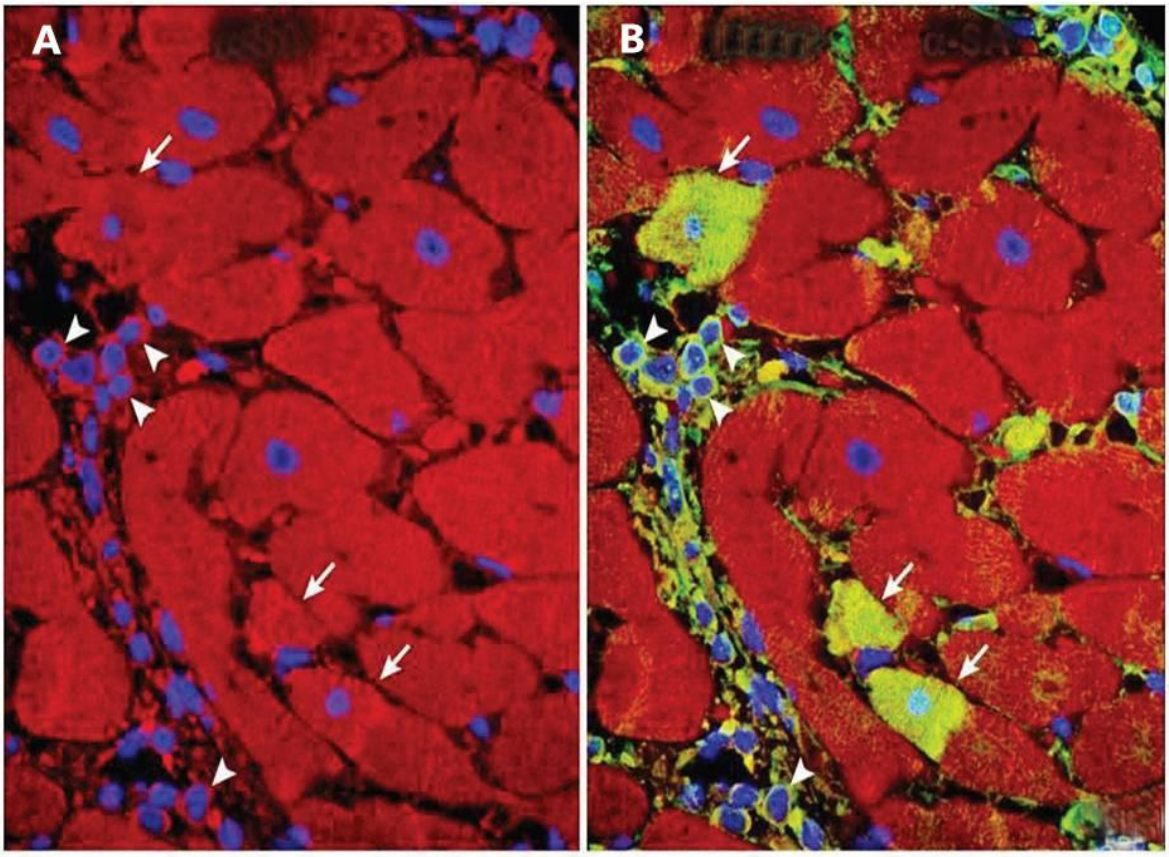


Figure 9: La régénération myocardique avec un modèle canin de transplantation cardiaque orthotopique.
Les cellules transdifférenciées sont quasi-identiques aux cardiomyocytes natifs (A). Les cellules colorées par *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) (indiquées par les flèches blanches) dans la section droite du panneau (B) étaient des CSCs dérivées du cœur du receveur. Après l'injection intracoronaire, elles sont intégrées au myocarde du cœur transplanté et différenciées en cellules couplées électriquement et mécaniquement avec les cardiomyocytes natifs (d'après D'Alessandro DA[120] *et al., Circulation Research 2009*).

2.7.7 Les cardiosphères

Les « cardiosphères » sont décrites pour la première fois en 2004 par Messina[115] *et al*. En utilisant la sous-culture d'échantillons de biopsies atriales et ventriculaires de cœurs murins, ils ont réussi à isoler et à identifier une population de cellules qui se développaient en amas auto-adhésifs et qui pouvaient se différencier en cardiomyocytes, cellules endothéliales et myocytes lisses. Messina *et al.* qualifiaient ces amas de « cardiosphères ». En 2007, Smith[121] *et al.* introduisaient une méthode d'acquisition de cellules dérivées des cardiosphères à partir d'échantillons de biopsies endomyocardiques. Les cellules dérivées de cardiosphères ont

montré leur capacité à se différencier *in vitro* en cardiomyocytes stables électriquement, à favoriser la régénération cardiaque et à améliorer la fonction cardiaque. Phénotypiquement, les cardiosphères et les cellules dérivées de cardiosphères sont un mélange de cellules hétérogènes constitué de cellules exprimant les marqueurs caractérisés des cellules endothéliales (CD31, KDR pour l'homme/flk-1 pour la souris), de CSCs (CD34, c-kit, Sca-1) et de CSMs (CD105, CD90). Par contre, le type de cellules responsables des effets observés reste inconnu.

2.7.8 Résumé de la thérapie cellulaire cardiaque

La dernière décennie a été témoin de la publication en nombre d'études expérimentales et cliniques de la thérapie cellulaire cardiaque avec différents types de cellules et différentes voies d'administration (**tableau 3**[107]). Il est difficile d'interpréter les résultats si divers concernant les types cellulaires et leurs quantités, la voie et le timing d'administration, les indications et l'efficacité clinique, etc. Malgré tout, les études cliniques de première génération ont approfondi notre compréhension de l'application des cellules souches en montrant que : (1) la thérapie cellulaire est sans danger, (2) elle possède une efficacité modérée ; (3) les CSMs ne se différencient pas en cardiomyocytes, ni en cellules composantes vasculaires, (4) les cellules administrées montrent une faible rétention (< 10 % sur 24 heures) et une intégration insuffisante (< 1 % sur 4 semaines) ; (5) la signalisation *homing* moléculaire est dyssynchrone[4].

Table 3: Résumé de la thérapie cellulaire cardiaque avec des CSMs [107]

Voies d'administration	Mécanismes proposés	Effets observés
Perfusion intraveineuse	Intégration transdifférenciation	Diminuer le remodelage post-infarctus
Injection intracoronaire	Angiogenèse	Induire un remodelage inverse
Injection intramyocardique	Effets paracrines	Réduire la taille de l'infarctus
	Effets anti-inflammatoires	Améliorer la perfusion tissulaire
	Favoriser la réparation intrinsèque	Améliorer la contractilité régionale
		Promouvoir la fraction d'éjection

Les principaux mécanismes de la thérapie cellulaire cardiaque sont la médiation par les effets paracrines, plus précisément, par la libération des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance qui inhibent l'apoptose et la fibrose, améliorent la performance cardiaque et activent

les mécanismes de réparation intrinsèque en recrutant les cellules souches circulantes et locales. Les pistes d'avenir en matière de thérapie cellulaire cardiaque incluent (1) l'utilisation des cellules capables de différenciation en phénotypes cardiaques, telles que les CSCs et les cardiosphères, (2) le préconditionnement des cellules pendant les processus d'expansion *in vitro* pour améliorer la survie et l'intégration cellulaire après la transplantation et (3) l'application de bio-matériels pour rétablir les matrices extracellulaires.

2.8 L'oxygène : élément crucial dans la biologie des cellules souches

Les techniques d'isolement et de culture *in vitro* de cellules souches nous ont largement permis d'approfondir nos connaissances sur le rôle et la composition de la niche de cellules souches. Comme toutes les lignées cellulaires établies, les cellules souches sont cultivées dans un milieu où la concentration en oxygène est équivalente à celle de l'air ambiant. Les chercheurs se concentrent sur l'identification des facteurs de croissance et des protéines de signalisation sans prêter attention aux facteurs métaboliques comme l'oxygène dans la niche physiologique[122]. Cependant, les études récentes ont montré que la concentration en oxygène influence grandement la biologie des cellules souches embryonnaires et adultes[123,124]. Ces observations, associées à la technique d'oxygènométrie tissulaire, donnent lieu à une hypothèse : l'oxygène est un élément crucial dans le milieu métabolique de la niche.

En fait, les concentrations d'oxygène dans les tissus sont considérablement différentes de celles de l'air ambiant inhalé (160 mm Hg). La pression partielle d'oxygène (pO2) diminue progressivement après l'échange gaz-sang et la circulation corporelle. Au moment où l'oxygène arrive dans les organes et les tissus, la concentration en oxygène chute à 2-9 % (14-65 mm Hg)[125]. Physiologiquement, les concentrations sont considérées comme étant en état de normoxie[126]. Néanmoins, la normoxie physiologique peut correspondre à une concentration élevée pour certains types de cellules ou insuffisante pour d'autres types de cellules. Par exemple, la pO_2 dans les tissus dont le réseau vasculaire est peu développé, comme dans la médulle rénale ou la rétine, peut descendre jusqu'à 1 % (7,2 mm Hg)[127]. D'un point de vue moléculaire, la normoxie physiologique sert à conserver les fonctions de certaines molécules telles que les facteurs de transcription inductibles par hypoxie (HIFs), les canaux

ioniques sensibles à l'oxygène et les molécules engagées dans la réponse de stress du réticulum endoplasmique[128,129].

2.8.1 Le rôle régulateur de l'oxygène sur la biologie des CSMs

Comme les CSMs sont les candidats cellulaires les plus utilisés dans les études de thérapie cellulaire cardiaque, nous allons nous focaliser sur le rôle de l'oxygène sur la biologie de CSMs. Bien que les CSMs soient présentes dans les niches périvasculaires, les tissus où les CSMs résident sont généralement hypoxiques[130,131]. L'hypothèse a été posée que la condition hypoxique est essentielle pour leur maintien à l'état indifférencié. Les CSMs humaines cultivées en hypoxie montrent une diminution de différenciation en adipocytes et ostéocytes par rapport à celles cultivées en normoxie. Cela suggère qu'une concentration faible en oxygène favorise un état indifférencié.

Les CSMs cultivées en hypoxie présentent une capacité migratoire plus élevée que celles cultivées en normoxie[11]. La culture en hypoxie active la voie de signalisation Akt, régularise à la hausse c-Met, récepteur du facteur de croissance d'hépatocytes, favorise l'expression de VEGF et celle des récepteurs de chimiokines tels que CXCR4 et CX3CR1[132,133]. Les cytokines et chimiokines sécrétées par les tissus ischémiques/hypoxiques servent à recruter les CSMs dans le site lésé. Après migration dans les tissus ciblés, les CSMs libèrent les facteurs angiogéniques[134] et expriment les enzymes pour dégrader les matrices extracellulaires[135]. L'angiogenèse et le renouvellement des matrices extracellulaires sont tous les deux des processus cruciaux pour la réparation tissulaire. Etant donné que les techniques d'isolement et de culture de CSMs varient d'un laboratoire à un autre[136], il est difficile de tirer une conclusion générale concernant le rôle de l'hypoxie sur les caractéristiques biologiques de CSMs. Cependant, la concentration en oxygène est sans doute un régulateur important dans la détermination du destin cellulaire et dans le maintien d'un état indifférencié.

2.8.2 L'assistance ventriculaire mécanique et le remodelage inverse

La thérapie cellulaire cardiaque peut être considérée comme une stratégie thérapeutique visant la zone infarcie et ayant comme objectif définitif de régénérer le myocarde. C'est une méthode

moyennement efficace et il reste encore beaucoup de difficultés à surmonter avant une application extensive au niveau clinique. Il existe par contre un autre choix thérapeutique efficace, bien reconnu et établi pour traiter l'IC avancée : « les dispositifs d'assistance ventriculaire » (DAV). C'est une technique établie initialement afin de résoudre le problème de la pénurie d'organes. Ils sont implantés soit chez les patients en attente de la intégration cardiaque (*bridge to transplantation*), soit chez les patients contre-indiqués pour la intégration cardiaque (*destin therapy*). Les fonctions principales des DAVs consistent (1) à restaurer une hémodynamique correcte et à assurer la perfusion tissulaire, (2) à corriger le milieu neuro-hormonal maladaptatif et à rompre le cycle vicieux dans l'évolution de l'IC[13,16,17]. Au niveau cardiaque, les DAVs permettent de rétablir la morphologie et la fonction des cardiomyocytes souffrant d'une surcharge de pression et de volume. Comme la régénération des cardiomyocytes reste jusqu'à maintenant un phénomène rare et difficile, le concept de sauvetage/protection des cardiomyocytes survivants mais souffrants représente une stratégie plus raisonnable et bénéfique.

L'IC se caractérise par une dilatation ventriculaire progressive et une dysfonction cardiaque, surnommées « remodelage ventriculaire », en raison du stress mécanique anormal et de l'activation chronique neuro-hormonale[17–19]. Au niveau cellulaire, les changements histologiques comprennent l'hypertrophie, le glissement et l'apoptose de cardiomyocytes ainsi que la fibrose interstitielle. Depuis longtemps, le processus du remodelage ventriculaire est considéré comme unidirectionnel. Cependant, le concept d'irréversibilité du remodelage ventriculaire a été réfuté car l'inversion complète ou partielle de ce processus a été retrouvée chez les patients traités par les dispositifs d'assistance ventriculaire (DAVs)[137]. L'assistance circulatoire avec les DAVs conduit à une inversion de la dilatation cavitaire cardiaque, à une réduction de la masse myocardique et à une amélioration de la fonction contractile. Ces changements macroscopiques sont généralement appelés « remodelage inverse » (**figure 10**). Les études ultérieures ont montré que le remodelage inverse est le résultat d'une série d'événements incluant les changements de phénotypes cellulaires, la reconstruction des matrices extracellulaires, la régulation des réponses inflammatoires et l'amélioration du milieu neuro-hormonal[138].

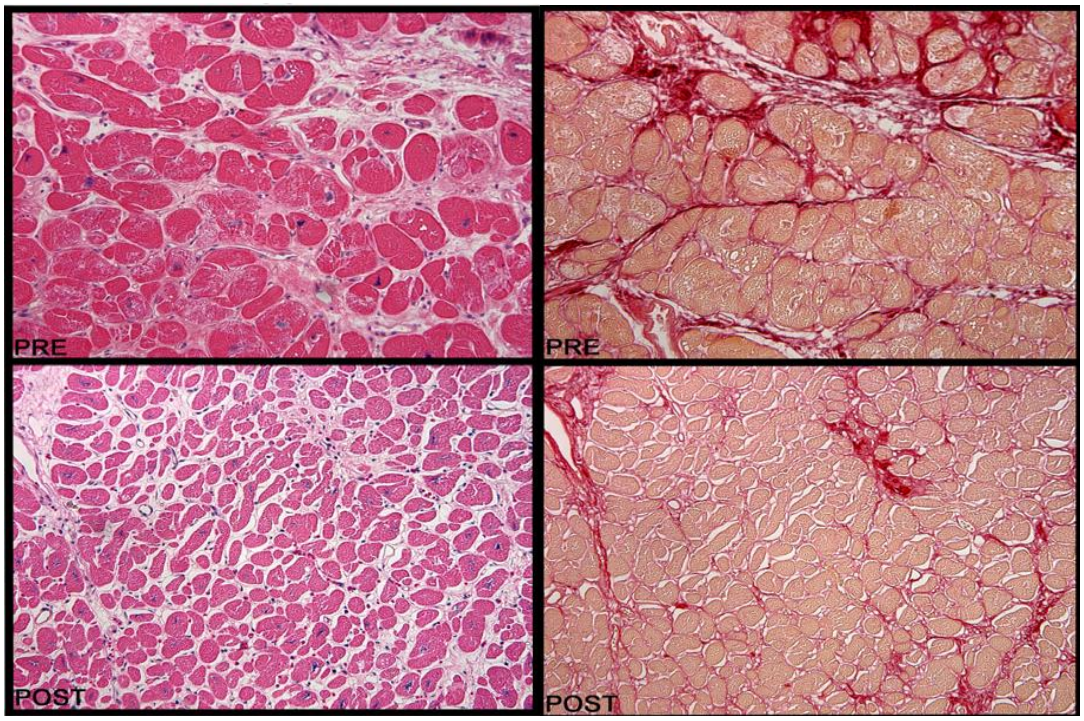


Figure 10: Le remodelage inversé avec les DAVs.

Les sections appariées démontrent une régression de l'hypertrophie des cardiomyocytes et une diminution de la quantité des collagènes après la mise en place de DAVs par rapport aux conditions sans DAVs (d'après M. Vatta[139] *et al., The Lancet* 2002).

Pendant des années, les DAVs ont été utilisés comme une méthode *bridge to transplantation ;* les cas anecdotiques de récupération complète de la fonction cardiaque ont été rapportés, suggérant la possibilité de l'implantation de DAVs comme *bridge to recovery*. Avec l'accumulation d'expériences dans l'implantation de DAVs chez les patients avec un objectif *bridge to recovery*, plusieurs centres ont rapporté leurs expériences d'explantation de DAVs suite à la récupération cardiaque. Mais les résultats concernant les proportions de patients *bridge to recovery* et de patients ayant une récupération soutenue après l'ablation de DAVs étaient largement hétérogènes. Il y a effectivement une lacune majeure entre les effets bénéfiques structuraux et fonctionnels apportés par les DAVs et le fait que peu de patients puissent bénéficier d'un *bridge to recovery.* En 1996, Levin[140] *et al.* ont rapporté pour la première fois le cas d'un patient de 19 ans qui avait présenté une IC fulminante de type cardiopathie dilatée idiopathique. Après 183 jours d'assistance avec le DAV, il avait récupéré considérablement sa fonction cardiaque et le DAV avait été enlevé. Malheureusement, le patient

a rapidement fait une rechute et est mort de l'IC. Mancini[141] *et al.* ont essayé d'identifier les candidats potentiels *bridge to recovery* par le test d'exercice en diminuant le débit des DAVs. Ils ont seulement réussi à sevrer les DAVs chez 5 des 111 patients. Dans l'autre étude réalisée par Birks et Yacoub[142], la récupération cardiaque a eu lieu chez 11 patients sur 15 souffrant d'une IC de type cardiopathie dilatée idiopathique, avec traitements adjuvants, y compris le β-bloquant, les IECs et l'agoniste du récepteur β2-adrénergique clenbutérol. En dehors des résultats discordants concernant le ratio de *bridge to recovery*, la manque de marqueurs cliniques prédisant la récupération cardiaque est un autre problème. Les méthodes les plus utilisées pour sélectionner des patients sevrables sont le test à l'effort et l'échocardiographie pendant la diminution de débit[143]. Mais aucun des deux tests ne prédit le risque de récidive. Les études expérimentales ont suggéré que les peptides natriurétiques (ANP, BNP) et le TNF-α pouvaient être des marqueurs biologiques mais les études cliniques ont éliminé leurs valeurs de prédictabilité[144].

2.8.3 Différents types de DAVs

Les DAVs sont typiquement constitués de trois éléments principaux : une pompe recevant le flux sanguin par la canule d'entrée et injectant du sang par la canule de sortie, un contrôleur ambulatoire pour régler les paramètres opérationnels et une source d'énergie pour alimenter le dispositif. Dans des conditions normales, la pompe tire du sang dans le VG à travers la canule d'entrée et réinjecte du sang dans l'aorte ascendante par la canule de sortie ; la valve aortique reste fermée la plupart du temps et le VG peut être considéré comme un atrium avec une pression intra-cavitaire basse. En fonction des caractéristiques du flux généré, les DAVs sont catégorisés en DAVs pulsatiles (produits de première génération) ou en DAVs avec flux en continu (produits plus récents) (**figure 11**). Les DAVs pulsatiles sont équipés d'une plaque poussoir qui propulse le sang du VG vers l'aorte ascendante d'une manière pulsatile à l'instar d'une circulation physiologique. Les valves dans les canules d'entrée et de sortie assurent un flux unidirectionnel dans le système. Les DAVs avec flux en continu sont équipés de pompe centrifuge qui crée un flux non pulsatile. La vélocité du flux dépend du gradient de pression à

travers la pompe et le flux est peu variable pendant le cycle cardiaque.

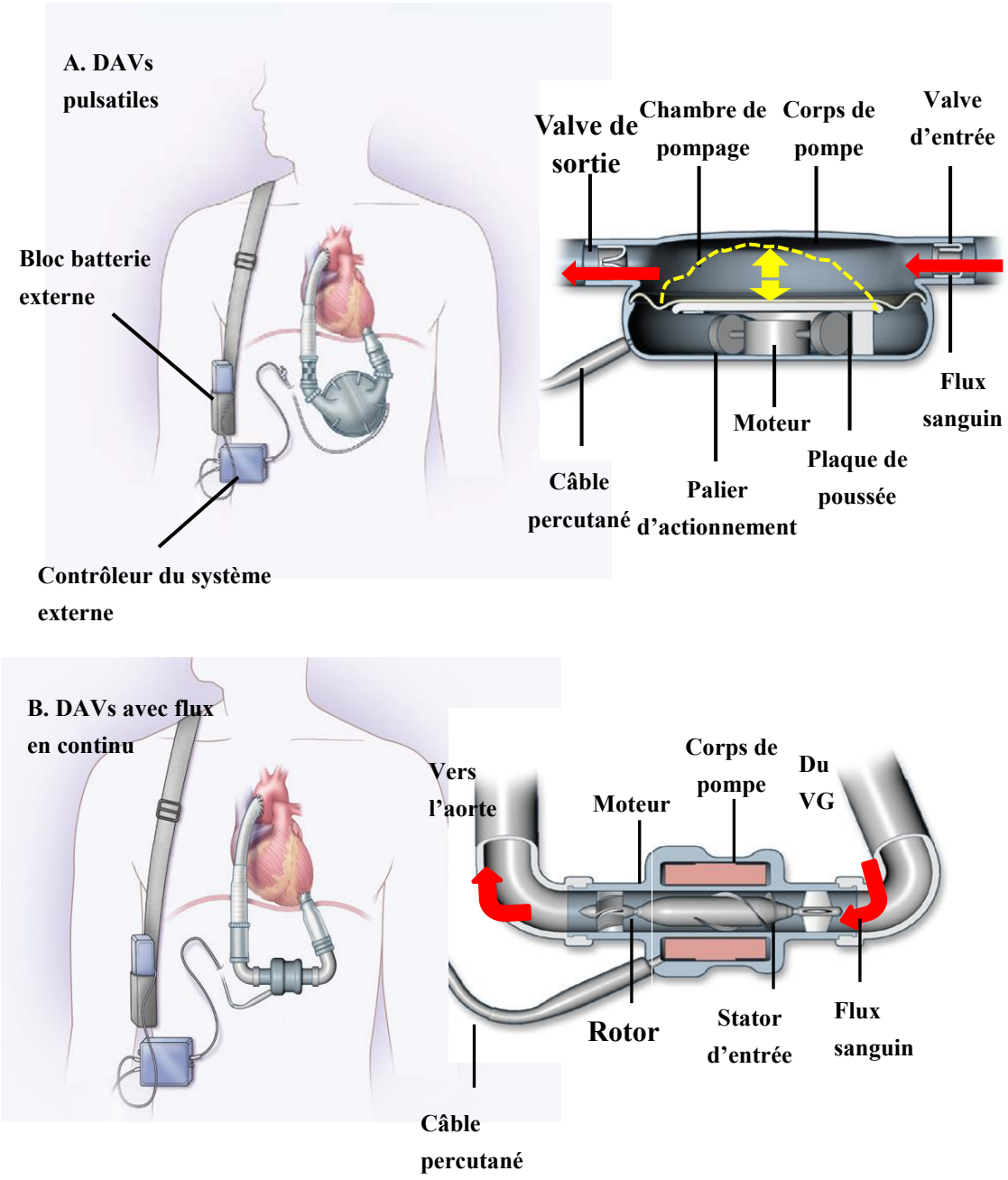


Figure 11:DAVs pulsatiles et DAVs avec flux en continu.

(d'après Slaughter[145] *et al., The New England Journal of Medicine* 2009)

Comparés aux DAVs pulsatiles, les DAVs avec flux en continu possèdent plusieurs avantages : ils sont plus petits en taille, ont une meilleure durabilité, provoquent moins de thrombogénicité et sont moins traumatisants sur le plan chirurgical. Plusieurs études ont montré que l'application de DAVs avec flux en continu était associée à un résultat similaire voire meilleur comme objectif de *bridge to transplantation* mais la qualité de vie était mieux

conservée et les complications post-opératoires étaient réduites par rapport aux DAVs avec flux en continu[145,146]. Cependant, les DAVs créent un flux sanguin non-pulsatile qui n'est pas physiologique ; des controverses existent en ce qui concerne l'influence du flux non-pulsatile en perfusion tissulaire, en circulation lymphatique, en architecture cardiovasculaire et en milieu neurohormonal[147,148]. De plus, les DAVs pulsatiles assurent une décharge de volume plus importante que les DAVs avec flux en continu[149]. L'ouverture régulière de la valve aortique est observée chez 10 % des patients porteurs de DAVs pulsatiles mais chez 50 % des patients avec des DAVs avec flux en continu, suggérant une diminution de la pression intra-ventriculaire plus profonde avec les DAVs pulsatiles[17]. Kato[149] *et al.* ont montré que la diminution des marqueurs plasmiques d'IC (BNP, MMP9) était plus importante chez les patients avec des DAVs pulsatiles que chez ceux avec des DAVs non pulsatiles. Les données *bridge to recovery* sont issues d'expériences cliniques menées avec des DAVs pulsatiles dans les années 1990 ; il n'y a pas de données connues ayant trait à l'apparition et à l'application étendue des DAVs avec flux en continu.

2.8.4 Transplantation cardiaque hétérotopique : un modèle animal pour simuler les DAVs

Le modèle animal de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH) a été établi pour la première fois par Alexis Carrel en 1905. Il a essayé d'implanter le cœur du chiot donneur dans le cou du chien receveur. Le greffon a survécu pendant 2 heures avant de mourir de thrombose intracavitaire[150]. En 1993, Manne *et al.* ont simplifié la technique de Carrel en anastomosant l'aorte ascendante du greffon à l'artère carotidienne du receveur de manière termino-latérale et l'artère pulmonaire du greffon à la veine jugulaire du receveur. Les veines caves et les veines pulmonaires étaient ligaturées[150]. En 1985, Michler[151] *et al.* ont décrit une xénogreffe porc-babouin en position cervicale. En raison de l'espace limitée, la TCH cervicale n'est pas toujours faisable. Minanov[152] *et al.* ont essayé de positionner le greffon dans la fosse iliaque. Abotte[153] *et al.* ont décrit pour la première fois la technique de TCH abdominale chez le rat en 1964. Le désavantage avec leur technique était que l'aorte abdominale du receveur était transséquée et anastomosée avec l'aorte ascendante du donneur. Le taux de réussite était bas car

la transsection de l'aorte abdominale est mal supportée. En 1969, Ono et Lindsey[154] ont modifié cette technique (**figure 12A**) en faisant l'anastomose latéro-terminale entre l'aorte abdominale et l'aorte ascendante. Cette modification a beaucoup amélioré le taux de réussite du modèle de TCH abdominal. Depuis, la technique d'Ono est devenue la technique la plus utilisée pour les études portant sur la biologie de la transplantation cardiaque et pour simuler la décharge mécanique. Comme le greffon hétérotopique partage les mêmes paramètres hémodynamiques et le même milieu neuro-hormonal, le modèle de TCH abdominal est un modèle idéal pour étudier les effets de dénervation et de décharge mécanique sur les greffons cardiaques. La caractéristique principale est que la pression et le volume sanguin dans le VG sont beaucoup réduits par rapport au cœur orthotopique, du fait que le VG du greffon est privé de la circulation systémique du receveur (*non-volume-loaded*). Le greffon est viable mais non fonctionnel physiologiquement.

Il est reconnu que le greffon hétérotopique présente très tôt après la chirurgie (24-48 heures après la transplantation) des changements métaboliques et fonctionnels[155]. Le phénotype atrophique myocardique et l'altération de la synthèse des protéines conduisent à une détérioration de la contractilité et à la relaxation[156]. Dans l'objectif de créer un modèle de TCH *volume-loaded*, plusieurs modifications ont été proposées à la technique de base d'Ono, y compris (1) l'induction d'une régurgitation aortique par exérèse d'un cusp valvulaire[157] ; (2) la création d'une communication intra-atriale[158] et (3) l'ajout d'une anastomose entre l'oreillette gauche du greffon et l'aorte abdominale du receveur[159]. Bien que les modifications techniques permettent de charger le VG du greffon avec du sang artériel régurgité ou du sang veineux shunté, ils ont leurs propres désavantages tels que la compromission de l'intégrité structurale du greffon et la prolongation du temps opératoire. Le modèle murin de TCH cœur-poumon (**figure 12B**) a été décrit par Mizuno[160] *et al.* et avait comme objectif initial de simuler l'ablation de DAVs. Le modèle de TCH cœur-poumon peut être considéré comme *volume loaded* parce que le VG du greffon est partiellement rempli par le sang passant dans le réseau coronaire après la circulation pulmonaire.

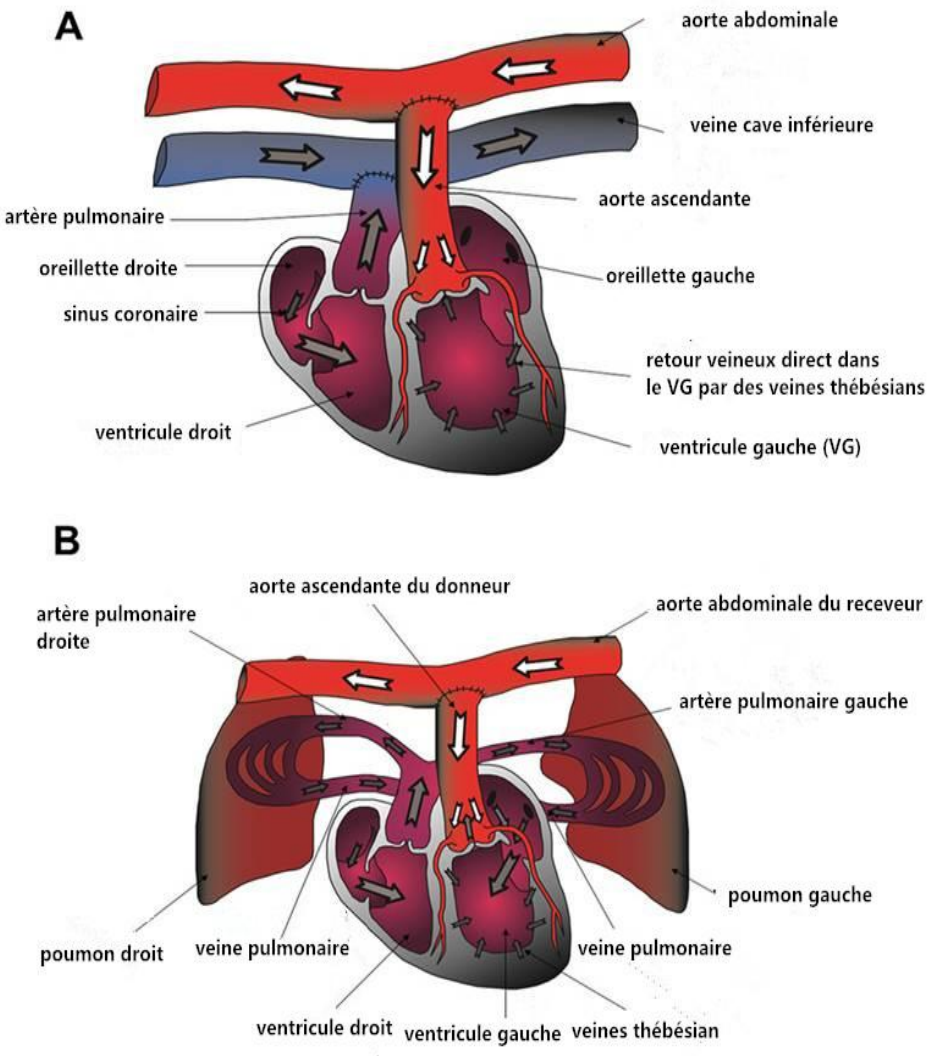


Figure 12: Deux modèles murins de transplantation cardiaque hétérotopique.

Les images illustrent deux modèles murins de décharge mécanique ventriculaire complète (TCH cœur seul, A) et partielle (TCH cœur-poumon, B). Les flèches montrent la circulation sanguine passant dans le greffon (d'après Ibrahim M.[161] *et al., Journal of Surgical Research* 2012).

3. Méthodes et résultats

L'étude n°1 a donné lieu à la publication d'un 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, Fatiha Maskali, Frédérique Groubatch, Gilles Karcher and Nguyen Tran

The International Journal of Cardiovascular Imaging 2013; 29(4): 809-17.

L'étude n°2 a donné lieu à un article soumis

Long-term hypoxic cell culture enables a higher therapeutic potential of rat bone marrow mesenchymal cells in the treatment of chronic myocardial infarction

Nguyen Tran, Yihua Liu, Aude Falanga, Vanessa Marie, Guillaume Gauchotte, Chloé Claussner, Sylvain Poussier, Frédérique Groubatch, Pierre-Yves Marie, and Pablo Maureira

L'étude n°3 a donné lieu à la publication d'un article

Impact of chronic left ventricular unloading on myocardial remodeling: multimodal assessment of two heterotopic heart transplantation techniques

Yihua LIU, Pablo MAUREIRA, Guillaume Gauchotte, Aude FALANGA, Vanessa MARIE, Arnauld OLIVIER, Frédérique Groubatch, Céline Gu, Pierre-Yves MARIE, and Nguyen TRAN

J Heart Lung Transplant.

3.1 Etude n°1: Etude de la perfusion myocardique chez le rat atteint de l'infarctus chronique traitée par l'injection des cellules souches mésenchymateuses en intramyocardique

Résumé :

Après l'infarctus du myocarde (IDM), la privation persistante de la perfusion sanguine dans la zone infarcie contribue principalement à l'évolution vers le remodelage ventriculaire et l'insuffisance cardiaque. Depuis les trois dernières décennies, une nouvelle stratégie thérapeutique à la base d'injection des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivées de la moelle osseuse a été intensément étudiée. La recherche expérimentale a mis en évidence une amélioration de la perfusion myocardique dans l'infarctus après l'injection des CSMs. Les mécanismes sous-jacents ont été postulés à une vasculogénèse renforcée dans le site de transplantation des cellules par leur effet de transdifférenciation en cellules composantes vasculaires, ou l'effet paracrine par l'intermédiation des cytokines angiogéniques, notamment la *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, ou l'effet de la modulation inflammatoire.

Dans une étude préliminaire, nous avons observé une amélioration de la perfusion myocardique dans l'infarctus ainsi que dans la zone éloignée à court terme après l'injection intramyocardique des CSMs. Mais il reste mal connu si ce phénomène est lié à une inflammation non spécifique relative à l'injection et si cet effet bénéfique est durable à long terme.

Pour aborder ce sujet, nous avons effectué une étude par un suivi d'imagerie pendant 6 mois à type de *single-photon emission computed tomography (SPECT)* à double acquisition ^{111}In/^{99}Tc. Les rats ont subi une la ligature coronaire (l'artère intraventriculaire antérieure) 4 mois auparavant pour créer un modèle d'IDM chronique. Le groupe traité (T, n=7) et le groupe contrôle (C, n=7) ont subi une injection en intramyocardique dans la zone des CSMs autolgues marquées à l'^{111}In ou le sérum physiologique, respectivement. A 48 heures, 1 mois et demi, 3 mois et 6 mois après l'injection, une série des imageries par ^{99}Tc-Sestamabi SPECT a été enregistrée pour le suivi de la perfusion myocardique et la fonction ventriculaire.

Nous n‟avons pas observé de différence significative concernant les paramètres quantitatives de la fonction ventriculaire (les volumes, la fraction d‟éjection) ni entre le groupe traité et le groupe de contrôle, ni entre pré- et post-injection dans les deux groupes. Cependant, on a observé une amélioration remarquable de la perfusion myocardique dans les groupes T et C à 48 heures post-injection (+10 ± 11% *versus* +8 ± 5%), dont la différence n‟était pas significative. Ensuite, le gain de perfusion a été diminué progressivement d‟une manière moins vite dans le groupe T que le groupe C, dont la différence était significative à 3 Mois- (+8 ± 10% *versus* -1 ± 5%, $p < 0,05$) et à 6 mois post-injection (+3 ± 10% *versus* -5 ± 3%, $p< 0,05$).

Le marquage à l‟ ^{111}In permettait d‟identifier la distribution des CSMs dans le cœur par rapport à la location de l‟infarctus. A l‟aide de SPECT à double acquisition ^{111}In/^{99m}Tc, nous pouvions diviser les cœurs dans le groupe T en quatre parties : la zone infarcie sans/avec intégration cellulaire, la zone non-infarcie sans/avec intégration cellulaire. Nous avons fait une sous analyse de l‟évolution de la captation du ^{99m}Tc de chaque zone et constaté que : 1). la perfusion myocardique restait stable et comparable dans les zones non-infarcies sans/avec intégration cellulaire ; 2). Une amélioration soutenue de la perfusion myocardique dans la zone infarcie sans intégration cellulaire (+10 ± 5% à 6 mois par rapport à la base) ; et 3). Par contre, la zone infarcie avec intégration cellulaire présentait une détérioration continue de la perfusion myocardique pendant le suivi (-9 ± 10% à 6 mois par rapport à la base).

Nous attribuons l‟amélioration de la perfusion myocardique à la phase aigüe (48 heures) à une inflammation réactionnelle suite à l‟injection qui est responsable d‟un traumatisme mécanique et à l‟apoptose des cellules injectées. Cependant, l‟amélioration soutenue de perfusion myocardique à 6 mois dans le groupe traité s‟explique par les effets thérapeutiques des CSMs notamment l‟effet angiogénique. Mais pourquoi la zone infarcie éloignée du site d‟injection bénéficie la plus de la thérapie cellulaire ? Comme nous avons injecté des CSMs dans plein milieu de l‟infarctus, tandis que la zone infarcie sans intégration cellulaire se situe plutôt à la frontière de l‟infarctus où existe une certaine viabilité résiduelle, qui signifie que la viabilité résiduelle dans la zone cible est cruciale pour la thérapie cellulaire avec les CSMs. Notre étude suggère aussi que l‟effet paracrine est éventuellement un mécanisme sous-jacent expliquant l‟amélioration de la perfusion myocardique dans les segments bordant le site d‟injection.

The International Journal of Cardiovascular Imaging X-Ray Imaging, Echocardiography, Nuclear Cardiology Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging

© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

10.1007/s10554-012-0147-9

Original Paper

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

Pablo Maureira[1, 2, 3], Pierre-Yves Marie[3, 4], Yihua Liu[1], Fengxu Yu[1], Sylvain Poussier[4], Fatiha Maskali[3, 4], Frédérique Groubatch[1], Gilles Karcher[4] and Nguyen Tran[1]

(1) Faculty of Medicine, School of Surgery, University of Lorraine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

(2) Department of Cardiovascular Surgery, Nancy University Hospital, Nancy, France

(3) INSERM U961, Faculty of Medicine, University of Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

(4) Nuclear Medicine Department, Nancy University Hospital, Nancy, France

Received: 9 June 2012

Accepted: 29 October 2012

Published online: 13 February 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}In/^{99m}Tc SPECT and Sestamibi gated-SPECT, left ventricle perfusion and function were monitored in all animals by serial ^{99m}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 benefice was sustained during the 6-month follow-up in the non-engrafted MI-areas from treated rats (at 6-months: +10 ± 5 %), whereas the engrafted ones, as well as the MI areas from control rats, exhibited progressive deterioration over time (at 6-months: −9 ± 10 % and −5 ± 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 MI areas was found to be significantly enhanced a few months after the surgical transplantation of BMSCs, even at distance of the sites of engrafted ^{111}In-BMSCs. It remained to be determined, however, to what degree this short-term enhancement relates to inflammatory reaction around the injection site and whether it persists at long term. The present study aimed at analyzing the long-term variations in the perfusion of chronic MI areas from rats after local injections of BMSCs, with a comparison between the BMSCs-engrafted sites and distant sites and using rats injected with a saline solution as a control group.

Materials and methods

Animals and general experimental protocol

This 10-month study was conducted in 14 Wistar rats (initial body-weight of 410–460 g). All experimental procedures were in accordance with our local ethical committee and with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996).

Four months after the surgical occlusion of the left anterior descending artery, rats were randomly assigned to receive an intra-myocardial injection of either BMSCs (treated animals, n = 7) or saline solution (control animals, n = 7). The protocol of coronary occlusion has been already detailed [1, 13] as well as the method of cell therapy that involved a single intramyocardial injection of ^{111}In-labelled autologous BMSCs (2×10^6 cells in 50 μL) within the targeted infarct area [8, 13]. This injection was followed 2 days later by a dual ^{111}In/^{99m}Tc-Sestamibi pinhole SPECT recording in order to localize the sites of engrafted ^{111}In-BMSCs [13]. Control animals had a similar injection procedure, except that injected cells were replaced by a 50 μL of a 9 g L^{-1} sodium chloride solution and that dual ^{111}In/^{99m}Tc-Sestamibi pinhole SPECT was replaced by a single ^{99m}Tc-Sestamibi pinhole SPECT.

Left ventricle (LV) perfusion and function were monitored in all animals by serial ^{99m}Tc-Sestamibi pinhole gated-SPECT (at 2 days following cell therapy and 1.5, 3 and 6 months thereafter).

Culture, labeling and transplantation of mesenchymal cells

Autologous bone marrow was harvested through a tibial puncture and BMSCs were cultured up to passage 1–2 as previously described [13]. In short, aspirated bone marrow cells were suspended in Iscove‟s modified Dulbecco‟s culture medium (IMDM, Gibco Laboratory, Life technologies) containing 10 % fetal bovine serum (Gibco Laboratory, Life technologies), 0.1 mmol/L β-mercaptoethanol (Sigma), 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin.

Cells were grown in a 5 % humidified CO_2 atmosphere at 37 °C, the medium being changed every 2 days.

Before transplantation, the cultured cells were trypsinized and incubated at 37 °C with 15 MBq of ^{111}In-oxine (Mallinckrodt Medical B.V., Holland) during a 10 min period (2×10^6 cells per mL), the labeling process being stopped by a 5-min centrifugation at 950g. Before injection, the cell viability and cell counting were performed using the trypan blue exclusion technique in small aliquot of the cell suspension. The 10-min labelling period with ^{111}In-oxine was found to do not affect the cell viability [13].

The ^{111}In-labeled cells were conditioned in an insuline syringe (2×10^6 cells in 50 μL) and a single injection was performed through a mini thoracotomy redux, within the core of visually-delineated fibrotic MI area, the animals being anaesthetized and mechanically ventilated in a similar way than during LAD ligation.

Recording and analysis of pinhole-SPECT images

Serial 99mTc-Sestamibi pinhole gated-SPECT were recorded according to a previously described method by using a conventional single-head gamma-camera (DSX, General Electric-SMV, Buc, France) equipped with a 3-mm pinhole collimator [1]. The animals were sedated by an intra-peritoneal injection of 60 mg/kg of sodium pentobarbital and data acquisition was started 40–60 min after the intravenous injection of 400–700 MBq of 99mTc-Sestamibi. Total acquisition time was 20 min.

Two days after intramyocardial injection, 200 MBq of 99mTc-Sestamibi were injected intravenously and a pinhole-SPECT was started 1 h later, with the recording of only ^{99m}Tc activity in rats treated by saline solution and of both activities from ^{99m}Tc and ^{111}In in rats treated by cell therapy (dual SPECT), as already described [12].

According to our previously detailed method [14–16], the pinhole-SPECT images were reconstructed using an OSEM iterative process and for gated-SPECT reconstructions, a temporal Fourier filtering was additionally incorporated. A standard clinical software provided quantitative polar-map displays of the tracer distributions on ungated images, according to the 17-segment division of LV and with the exclusion of the 2 proximal septal segments (membranous septal wall).

The LV segments showing BMSCs retention were identified visually on a paired display of the LV activities from ^{111}In-BMSCs and ^{99m}Tc-Sestamibi [12]. The LV segments, corresponding to the underperfused MI area were called MI-segments and they were defined as those showing a ^{99m}Tc-Sestamibi uptake lower than 70 % of the maximum voxel value on the pre-therapeutic Sestamibi pinhole-SPECT [14]. The extent of the segments ^{111}In-BMSC is defined by the area where the absorption is greater than 30 % of the maximum activity. LV end-diastolic and end-systolic volumes, as well as LV ejection fraction, were determined by the QGS software on the short-axis slices from ^{99m}Tc-Sestamibi gated-SPECT.

Histologic section analysis

At the end of the study, animals were put down by intravenous injection of pentobarbital and KCl and their hearts were excised. Cryosections of 5 μm thick passing through the site of cells injection were obtained and stained with the trichrome Hematoxylin-Eosin-Safran method and with Sirius Red.

Statistics

Quantitative variables were expressed as mean ± standard deviation and compared with non-parametric tests: Mann–Whitney tests for the unpaired comparisons performed between the treated and control animals, and Wilcoxon tests for the paired comparisons in each group. For each test, a p value < 0.05 was considered to be indicative of a significant difference.

Results

On the pre-therapeutic pinhole gated-SPECT (Table 1), all quantitative parameters of LV function (volume, ejection fraction) and perfusion (number of initially underperfused MI segments) were equivalent between the 7 rats subsequently referred to cell therapy and the 7 controls. All rats had underperfused MI segments (see examples in Figs. 1, 2, 3). After treatment, no difference could be documented at 6-months, between the treated and control groups, for the LV ejection fraction (52 ± 10 % vs 54 ± 6 %), end-systolic volume (144 ± 50 μL vs 145 ± 59 μL) and end-diastolic volume (296 ± 50 μL vs 309 ± 98 μL).

Table 1 Comparisons, between rats treated by cell therapy and rats treated by control saline solution, of the baseline pretherapeutic data extracted from pinhole gated-SPECT

	Cell therapy (n = 7)	**Controls** (n = 7)	*p* value
End diastolic volume (µL)	271 ± 48	293 ± 83	NS
End systolic volume (µL)	121 ± 50	137 ± 74	NS
Ejection fraction (%)	57 ± 11	56 ± 12	NS
underperfused MI segments (sestamibi uptake ≤70 %)	3.8 ± 1.9	3.7 ± 1.9	NS
Sestamibi uptake in the underperfused MI segments	59 ± 9 %	60 ± 8 %	NS

NS non significant

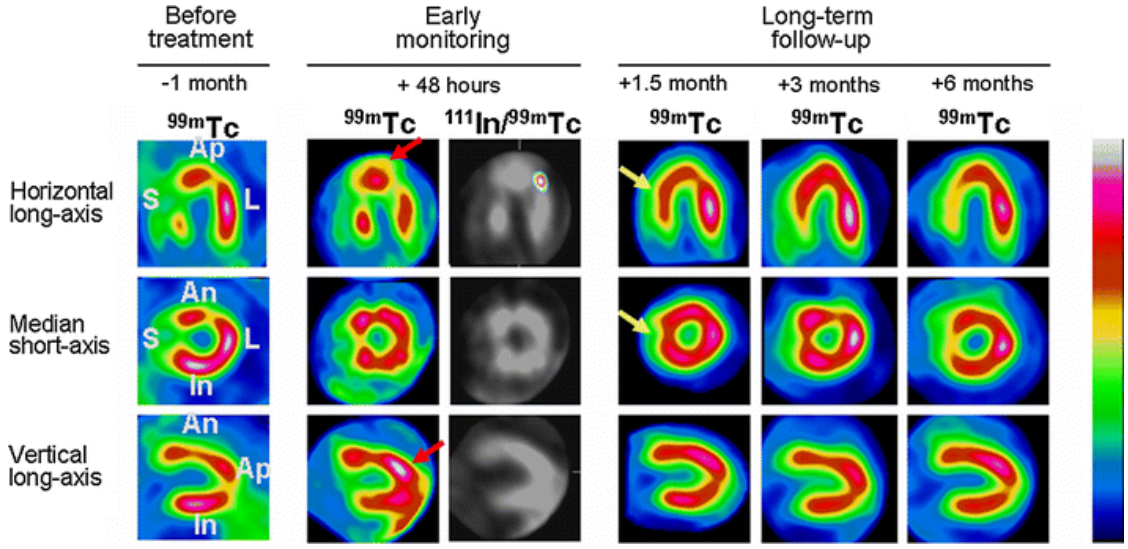


Fig. 1 Representative serial images provided by Sestamibi pinhole-SPECT in a treated rat: (1) before cell therapy, (2) during dual ^{111}In/^{99m}Tc-Sestamibi imaging 48-h after therapy and (3) during subsequent 6 months follow-up. The ^{111}In-BMScs could be implanted in the lateral and anterior part of the MI-area and a transitory perfusion enhancement was documented at 48-h (red arrows). This enhancement was dramatically at distance, on the septal part of the MI-area (yellow arrows), reaching a maximum at 3-months

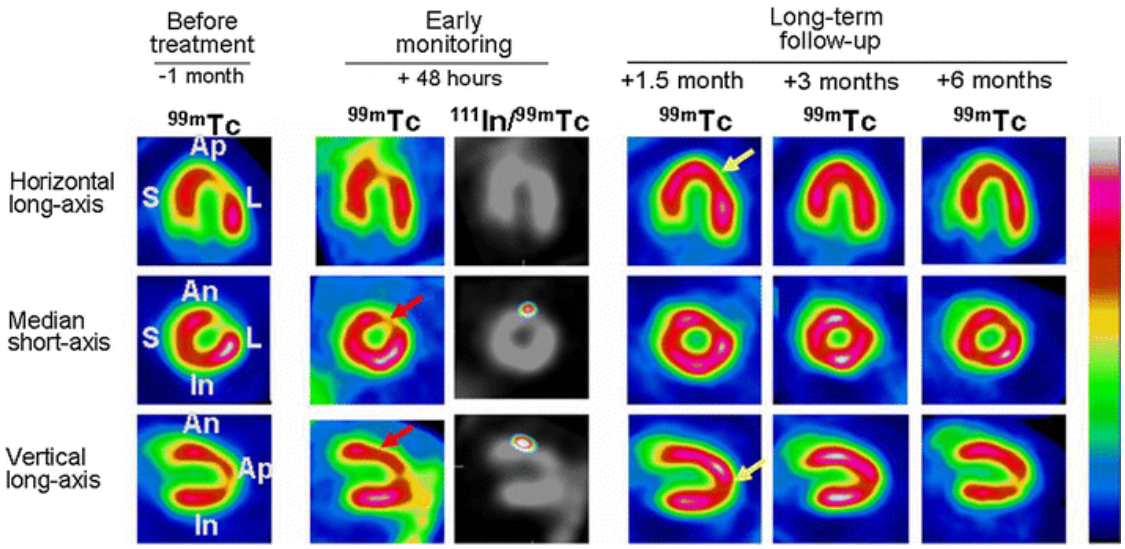


Fig. 2 Representative serial images provided by Sestamibi pinhole-SPECT in a treated rat: (1) before cell therapy, (2) during dual ^{111}In/^{99m}Tc-Sestamibi imaging 48-h after therapy and (3) during subsequent 6 months follow-up. The ^{111}In-BMScs could be implanted in the basal part of the anterior MI-area around which a perfusion enhancement was documented at 48-h (red arrows). This enhancement was more progressive at distance, on the apical part of the MI-area (yellow arrows), reaching a maximum at 3-months

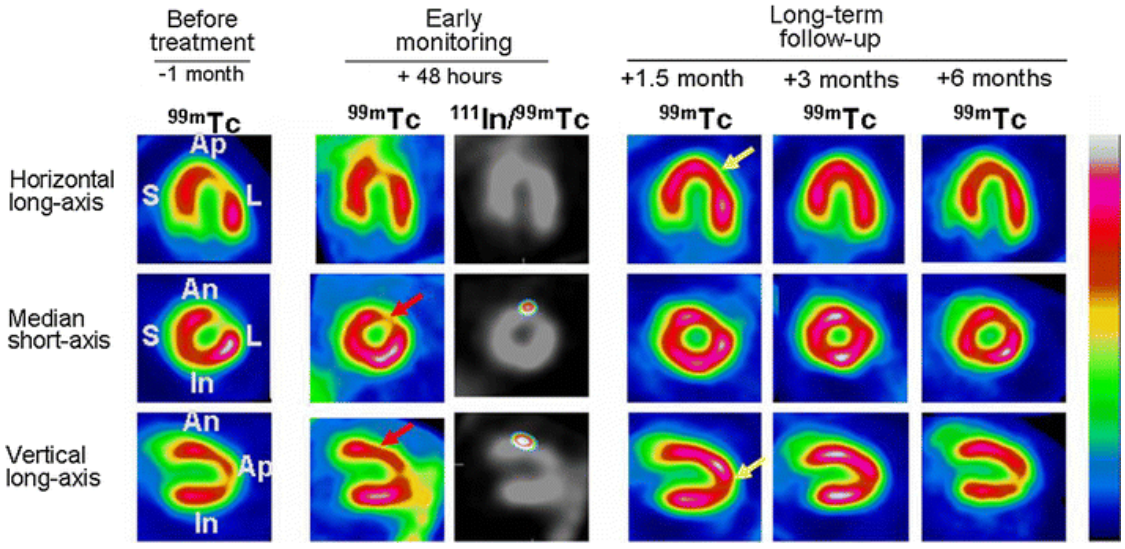


Fig. 3 Representative serial images provided by Sestamibi pinhole-SPECT in a control rat: (1) before cell therapy, (2) during dual ^{111}In/^{99m}Tc-Sestamibi imaging 48-h after therapy and (3) during subsequent 6-months follow-up. A transitory perfusion enhancement is documented within the MI areas at 48-h and to a lower degree at the 1.5 month control (red arrows)

On the dual-energy pinhole-SPECT, which was recorded 2 days after cells transplantation, segments with ^{111}In-BMSCs were detected in all the 7 rats from the treated group (2.9 ± 0.7

segments per rat, on average) (see Figs. 1, 2 for examples). These segments with ^{111}In-BMSCs were located: (1) within the MI underperfused area from 6 rats, allowing 6 engrafted MI areas to be identified (1.8 ± 0.7 segments per area), and (2) outside the MI underperfused area in 5 rats, allowing 5 engrafted non-MI areas to be identified (1.6 ± 0.9 segments per area). Finally, one or more underperfused MI segment had no evidence of ^{111}In-BMSCs in 6 rats, allowing 6 non-engrafted MI areas to be identified (2.7 ± 1.9 segments per area).

When considering the overall MI areas from all rats (Fig. 4), a post-therapeutic enhancement in myocardial perfusion was documented as soon as 48 h following intra-myocardial injection and was yet equivalent between treated rats and controls (% of variation of Sestamibi uptake relative to baseline: +10 ± 11 % vs +8 ± 5 %, NS) (see also Figs. 1, 2, 3 for examples). This enhancement subsequently decreased but at slower rates in treated compared with control rats, leading to reach significant differences between the 2 groups at 3- and 6-months of follow-up (% of variation relative to baseline at 6-months: +3 ± 10 % vs −5 ± 3 %, p = 0.03). The early but transitory enhancement in the perfusion of the MI areas from control group is illustrated by an example in Fig. 3.

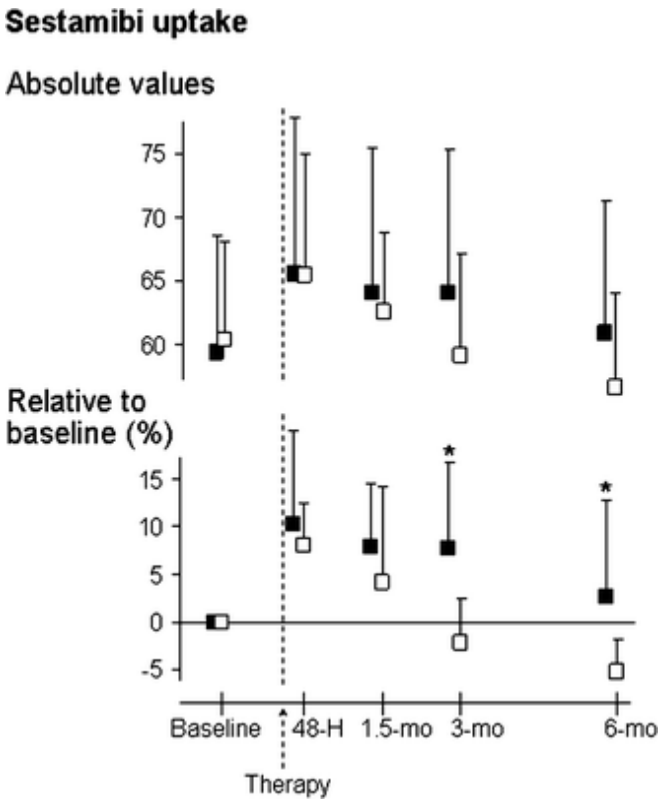


Fig. 4 Comparison between treated (n = 7, black symbols) and control (n = 7, white symbols) groups, of the time-evolutions of the perfusion of MI areas, assessed by the uptake of Sestamibi and expressed: (1) in absolute values (% of the maximal LV voxel activity; upper panel) and (2) relative to baseline (% of uptake variations with regard to pre-therapeutic values; lower panel). *p < 0.05 for unpaired comparisons

As detailed in Fig. 5 and when compared to the non-engrafted MI areas from treated rats, the engrafted ones had no significant trends toward: (1) a lower Sestamibi uptake at baseline (respective % of Sestamibi uptake at baseline: 62 ± 8 % and 56 ± 10 %) and (2) a higher increase in Sestamibi uptake at 2 days after transplantation (respective % of variation relative to baseline: +7 ± 7 % and +13 ± 15 %). This enhancement was sustained up to the 6-months control in the non-engrafted areas (% of variation between baseline and 6-months: +10 ± 5 %), although a slight but significant decrease was observed between 3- and 6-months (Fig. 4). By contrast, the engrafted Mi areas exhibited a marked deterioration of Sestamibi uptake all along the 6-months follow-up (% of variation between baseline and 6-months: −9 ± 10 %), similarly to that previously documented for the MI areas from control rats.

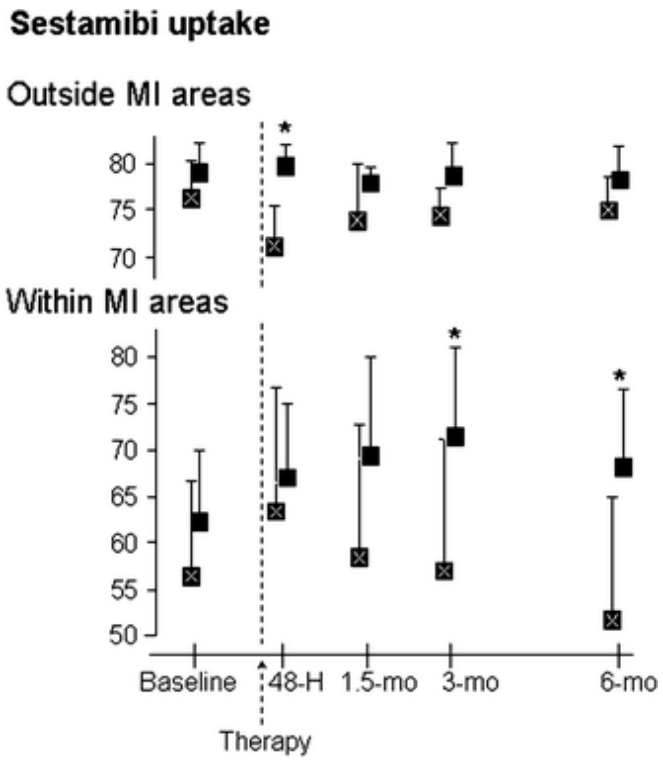


Fig. 5 Comparison of the time-evolutions of myocardial perfusion within the underperfused MI areas (lower panel) or outside (upper panel), for the engrafted (black symbols with crosses; n = 6 for MI and n = 5 for

non-MI areas) and non-engrafted (full black symbols; n = 6 for both MI and non-MI areas) myocardial areas from treated rats. *p < 0.05 for unpaired comparisons with engrafted areas.

A demonstrative example is in Fig. 1: the MI-related perfusion abnormalities were initially located: (1) on an anterior and lateral area where ^{111}In-labeled cells could be implanted and (2) on an additional septal area, untreatable by epicardial cells injection. A transitory perfusion enhancement was documented at 48-h around the transplantation site, whereas this enhancement was much more progressive and dramatic on the septal wall, reaching a maximum at the 3-months control.

In addition, it may be pointed out that the engrafted areas, which were located in remote myocardium, outside the MI areas, exhibited a significant but transitory decrease of myocardial perfusion at 2 days after transplantation (Fig. 5).

Finally, on the histological sections obtained at the end of follow-up (Fig. 6), macroscopic heart sections taken from control MI or MI treated rats exhibited similar density of fibrosis (red color in Sirius Red section). However, we noticed a different pattern in their microscopic architecture. In control chronic MI sections, histological studies highlighted very common characteristics of late chronic infarction i.e. high density of matrix collagen accompanied by a disappearance of myofibroblasts at sites of wound healing. It resulted in numerous empty lacunae. In heart sections taken from BMSCs treated animals, a high density of fibroblast-like cells with elongated nuclei and fusiform cytoplasm were documented in the engrafted MI areas, and border infarct areas appeared exhibiting an enhanced density of blood vessels (see examples in Fig. 6).

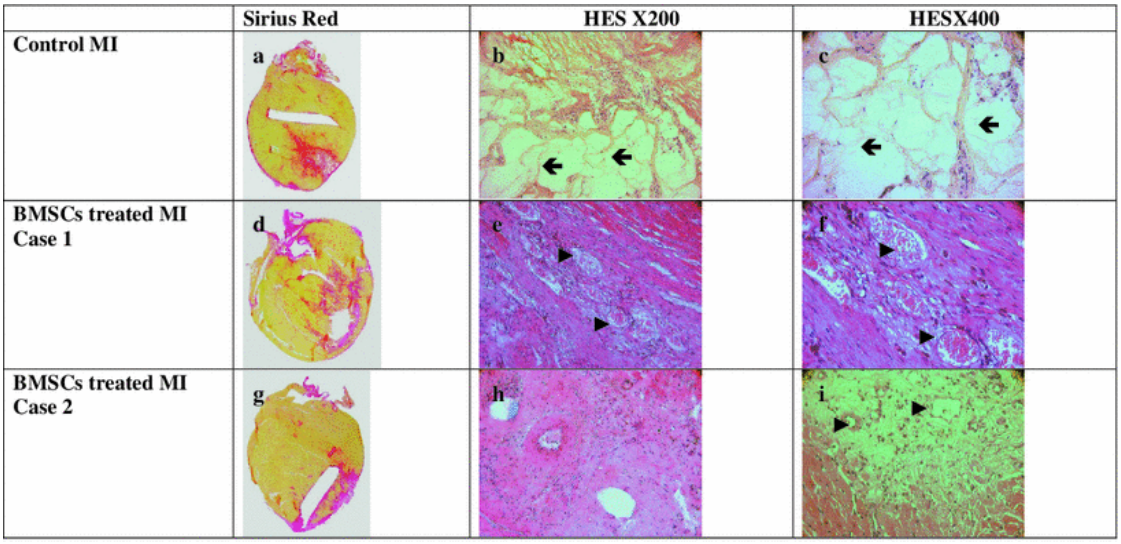


Fig. 6 Examples of macro- and micrographs taken from control MI (a–c) and BMSCs treated MI rat hearts harvested 10 months after MI (d–i). Macro sections (a, d, g) stained by Sirius Red (fibrosis in red and normal parenchyma in yellow) revealed similar high deposition of fibrosis in MI areas. In control chronic MI (HES sections, b, c), MI areas were characterized by dense collagenous layers separated by empty lacunae (black arrows) and few myofibroblasts. By contrast, MI areas of BMSCs treated animals (HES sections, e, f, and h, i) exhibited numerous myofibroblasts with elongated nuclei within collagenous layers along with documented functional vessels (arrow head) in the border zones.

Discussion

Current efforts are attempting to enhance the perfusion of MI areas by cell therapy with direct implantation of bone marrow derived stem cells (BMSCs). Previous studies had given evidence of an enhanced myocardial perfusion when this implantation was applied to areas of chronic MI [5, 7] and thus, at a stage where it might constitute an adjuvant treatment of surgical myocardial revascularization. It might be hypothesized, however, that an unspecific inflammatory reaction might play a role, at least during an initial phase, a point that is strongly supported by the data from the present study.

An enhanced perfusion of MI areas was, indeed, documented here by Sestamibi pinhole-SPECT, as soon as 2 days after the direct injection of BMSCs within 4-month old MI areas from rats [7]. However, a similar observation was achieved when ^{111}In-BMSCs were replaced by a saline control solution, giving evidence of an unspecific mechanism that might involve the inflammatory reaction to the injection process.

In a previous histopathological analysis [13], such a direct cells injection was also found leading to substantial tissue destruction, especially within normal myocardium, a point that is supported here by the observation of transitory mild decreases in myocardial perfusion when the cells were unexpectedly injected outside the MI areas (Fig. 4). When injected in chronic MI areas, by contrast, the BMSCs were previously found to be passively received within the large interstitial spaces of fibrotic areas, without evidence of marked cells or vessels destruction [13]. This traumatic injection is, however, likely to lead to a certain degree of inflammation, involving hyperaemia, vessels dilation and angiogenesis during subsequent healing, thereby explaining our observation of an enhanced perfusion in the first weeks, whatever the nature of the injected product (BMSCs or saline solution). Such a transitory perfusion enhancement is presumably close to that observed in studies where intramyocardial channels were produced by lasers, leading to a transitory perfusion enhancement at 1 month [17].

In the present study, a sustained enhancement in the perfusion of MI areas was still documented at 6-months of follow-up, but in only the group treated by BMSC and only outside the sites of initial cells‟ engraftment. In our preliminary report, a similar perfusion improvement was observed at a much shorter term and without any control group; and in a per-segment analysis, this improvement was found predominating outside the initially transplanted sites and especially in the MI areas showing the highest level of residual perfusion before transplantation (border zone). Such a predominance of considerable therapeutic effect was already documented more than 2 months after that bone marrow-derived mononuclear cells had been injected in the gastrocnemius muscles from critically ischemic legs [18]. Active angiogenesis was found distally in the limb, in areas of still viable but severely ischemic tissue, presumably because of the hypoxia-related secretion of angiogenic factors and of the recruitment of progenitor cells.

Tissue hypoxia is known to be the main stimulator of angiogenesis [19, 20] and it might be similarly involved in the present study since the non-engrafted MI areas, which were those exhibiting a sustained perfusion enhancement, were also likely to be those showing viable but severely ischemic tissue. These non-engrafted areas had, indeed, a higher level of Sestamibi uptake, a criterion that is indicative of a higher residual viability, even if the difference with the engrafted MI areas did not reach the level of statistical significance (Fig. 4). This may partly

relate to our attempt to inject the cells within the infarct core area, whereas it is mainly within the ischemic border zones that such a cell therapy might be expected to enhance angiogenesis, vessel density and thereby, myocardial perfusion. Our histological analyses give an additional support to this consideration while showing an enhanced capillary density within the border MI areas but not in the transplanted core MI areas.

Although the relative contribution of MSC related angiogenic factors are largely accepted [4, 5, 9, 10], the nature of these compounds and the underlying mechanisms are not clear-cut. Recent studies have pointed out the role of early paracrine effects of the implanted BMSCs [3, 21–24] and especially, the secretion of a great variety of cytokines [25], growth factors and also, chemotactic factors such as SDF-1 [26, 27]. Moreover, this early secretion activity could initiate a cascade of events leading to long-term beneficial effects either directly or indirectly through the activation of endogenous cardiac or circulating stem cells [28, 29]. These beneficial effects are mainly documented within the border zone, such as the enhancement in angiogenesis activity and vascular density, as well as the increases in the phosphocreatine/ATP levels [21, 30]. Other beneficial effects might also involve more diffuse actions against inflammation, fibrosis [24] and apoptosis [30], leading to spare myocytes [31, 32] and extracellular matrix on the overall infarct zone [33].

Thanks to the precise in vivo localisation of the initially transplanted cells, data stemmed from this study in chronic MI has also given evidence that the late beneficial effects of BMSCs were mainly documented in the non-transplanted sites of MI areas at 6 month, i.e. at a time when no interference may be expected from the inflammatory reaction due to the injection process. It would suggest further that the early paracrine effect could alleviate abnormality in chronic myocardial perfusion even distantly from the transplanted area and persist at least during the 6 month follow-up with a tendency, however, to a slow decline toward the basal status. All these observations might be resumed in a particular case displayed here in the Fig. 1. This MI animal presented stable myocardial perfusion abnormality in two myocardial segments: the septal and the antero-lateral separated by the apical one. The cells were implanted in the antero-lateral segment. Sequential SPECT exam following cell therapy have noted a significant increase in the perfusion within the cell-treated antero-lateral segments but also in the septal one that might be related to the paracrine effect of transplanted BMSCs. We hypothesize that

when small areas of hypoperfusion are patchily distributed in different but close anatomic sites, spreading among nonischemic areas, angiogenic action of BMSC might be able to compensate for the dysfunction of adjacent myocardium.

Finally, the reason of the unfavourable evolution of transplanted sites is presently unknown. It may partly relate to several disturbed metabolic and tissue conditions in the infarct core area, whereas it is mainly within border zone that such a cell therapy may be expected to enhance angiogenesis, vessel density and thereby, myocardial perfusion. Moreover, it may be questioned whether the apoptotic evolution of these cells may be accompanied by an unfavourable deterging and healing processes. It is indeed likely as we have previously shown that large amounts of BMSCs were retained up to the end of the first week [13], between the collagenous layers of the implanted MI sites, but most of these cells are known to undergo apoptosis at a longer term [34], thereby explaining a progressive decrease in the perfusion benefice.

From the above data, it appears that one must view the cell therapy induced reperfusion of chronic myocardial infarction in the overall complexity of the cellular environment. It is not easy to delineate the relevance of some of these reactions in vivo, but we can assume that some of the above-described interactions and pathways may be relevant in various MI conditions [35].

Our results also point to an important area where *in vivo* long term cell tracking fails to measure up. As the benefit in late MI is likely to be due to environmental or the time related paracrine factors particular to the repair mechanisms of BMSC, comparison group of MI recipients still requires careful identification methodologies [35] in order to better fit the corresponding in vivo retention and evolution of the engrafted cells and their contribution on the repaired native myocardial tissue.

Collectively, it appears that implanted cells could play an important role in the belatedly reperfusion of MI segments. Given the importance of chronic ischemia in the development of heart failure complications, reperfusion-induced by engrafted BMSC could be proved to be of significant therapeutic benefit in chronic MI patients.

Conflict of interest: None.

References

1. Maskali F, Franken PR, Poussier S, Tran N, Vanhove C, Boutley H, Le Gall H, Karcher G, Zannad F, Lacolley P, Marie PY (2006) Initial infarct size predicts subsequent cardiac remodeling in the rat infarct model: an in vivo serial pinhole gated SPECT study. J Nucl Med 47:337–344.

2. Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem 98:1076–1084.

3. Dai W, Hale SL, Kloner RA (2007) Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. Regen Med 2:63–68.

4. Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, Barry F, Nerem R (2009) Bone marrow derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time and dose dependent manner in vitro. Tissue Eng Part A 15:2459–2470.

5. Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, Stokkel MP, Fibbe WE, Van der Wall EE, Schalij MJ, Atsma DE (2007) Intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with chronic myocardial infarction and severe left ventricular dysfunction. Am J Cardiol 100:1094–1098.

6. Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, Muhs A, Spitkovsky D, Li RK (2005) Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. Circulation 112:I96–I104.

7. Tran N, Franken PR, Maskali F, Nloga J, Maureira P, Poussier S, Groubatch F, Vanhove C, Villemot JP, Marie PY (2007) 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. J Nucl Med 48:405–412.

8. Gao F, He T, Wang H, Yu S, Yi D, Liu W, Cai Z (2007) A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. Can J Cardiol 23:891–898.

9. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI (2005) Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. Ann Thorac Surg 80(1):229–236.

10. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI (2004) Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. Regul Pept 117:3–10.

11. Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, Li J (2007) Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. Eur J Cardiothorac Surg 31:438–443.

12. Tran N, Poussier S, Franken PR, Maskali F, Groubatch F, Vanhove C, Antunes L, Karcher G, Villemot JP, Marie PY (2006) Feasibility of in vivo dual-energy myocardial SPECT for monitoring the distribution of transplanted cells in relation to the infarction site. Eur J Nucl Med Mol Imaging 33:709–715.

13. Tran N, Li Y, Maskali F, Antunes L, Maureira P, Laurens MH, Marie PY, Karcher G, Groubatch F, Stoltz JF, Villemot JP (2006) Short-term heart retention and distribution of intramyocardial delivered mesenchymal cells within necrotic or intact myocardium. Cell Transplant 15:351–358.

14. Marie PY, Djaballah W, Franken PR, Vanhove C, Muller MA, Boutley H, Poussier S, Olivier P, Karcher G, Bertrand A (2005) OSEM reconstruction, associated with temporal fourier and depth-dependant resolution recovery filtering, enhances results from sestamibi and 201Tl 16-interval gated SPECT. J Nucl Med 46:1789–1795.

15. Vanhove C, Andreyev A, Defrise M, Nuyts J, Bossuyt A (2007) Resolution recovery in pinhole SPECT based on multi-ray projections: a phantom study. Eur J Nucl Med Mol Imaging 34:170–180.

16. Vanhove C, Franken PR, Defrise M, Deconinck F, Bossuyt A (2002) Reconstruction of gated myocardial perfusion SPET incorporating temporal information during iterative reconstruction. Eur J Nucl Med Mol Imaging 29:465–472.

17. Lauer B, Junghans U, Stahl F, Kluge R, Oesterle SN, Schuler G (1999) Catheter-based percutaneous myocardial laser revascularization in patients with end-stage coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 34:1663–1670.

18. Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P, Gaussem P, Dal-Cortivo L, Julia P, Fiessinger JN, Cavazzana-Calvo M, Aiach M, Emmerich J (2008) Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. Mod Pathol 21:837–846.

19. Belanger AJ, Lu H, Date T, Liu L, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C (2002) Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. J Mol Cell Cardiol 34:765–774.

20. Wu G, Mannam AP, Wu J, Kirbis S, Shie JL, Chen C, Laham RJ, Sellke F, Li J (2003) Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285:H2420–H2429.

21. Feygin J, Mansoor A, Eckman P, Swingen C, Zhang J (2007) Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H1772–H1780.

22. Haider H, Jiang S, Idris NM, Ashraf M (2008) IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair. Circ Res 103:1300–1308.

23. Li L, Zhang S, Zhang Y, Yu B, Xu Y, Guan Z (2009) Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. Mol Biol Rep 36:725–731.

24. Li L, Zhang Y, Li Y, Yu B, Xu Y, Zhao S, Guan Z (2008) Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with isoproterenol-induced global heart failure. Transpl Int 21:1181–1189.

25. Lee BC, Hsu HC, Tseng WY, Chen CY, Lin HJ, Ho YL, Su MJ, Chen MF (2009) Cell therapy generates a favourable chemokine gradient for stem cell recruitment into the infarcted heart in rabbits. Eur J Heart Fail 11:238–245.

26. Unzek S, Zhang M, Mal N, Mills WR, Laurita KR, Penn MS (2007) SDF-1 recruits cardiac stem cell-like cells that depolarize in vivo. Cell Transplant 16:879–886.

27. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS (2007) SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. Faseb J 21:3197–3207.

28. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA (2005) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 112:214–223.

29. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdzic D, Young R, Rippy MK, Virmani R, Litt H, Wilensky RL (2008) A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. Eur Heart J 29:251–259.

30. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lutzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G (2007) Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. Stem Cells 25:2118–2127.

31. Lee J, Stagg MA, Fukushima S, Soppa GK, Siedlecka U, Youssef SJ, Suzuki K, Yacoub MH, Terracciano CM (2009) Adult progenitor cell transplantation influences contractile performance and calcium handling of recipient cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 296:H927–H936.

32. Markel TA, Wang Y, Herrmann JL, Crisostomo PR, Wang M, Novotny NM, Herring CM, Tan J, Lahm T, Meldrum DR (2008) VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295:H2308–H2314.

33. Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Suntharalingam P, Boozer S, Mhashilkar A, Panetta CJ, Swingen C, Deans R, From AH, Bache RJ, Verfaillie CM, Zhang J (2007) Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. Circulation 115:1866–1875.

34. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Brand NJ, Barton PJ, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppen SR, Partridge TA, Yacoub MH (2004) Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. Circulation 110:219–224

35. Maureira P, Tran N, Djaballah W, Angioï M, Bensoussan D, Didot N, Fay R, Sadoul N, Villemot JP, Marie PY (2012) Residual viability is a predictor of the perfusion enhancement obtained with the cell therapy of chronic myocardial infarction: a pilot multimodal imaging study. Clin Nucl Med 37(8):738–742

3.2 Etude n°2: La culture cellulaire en hypoxie à long terme améliore les effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses murines autologues de la moelle osseuse pour traiter l'infarctus chronique du myocarde

Résumé:

Comme avoir démontré dans notre étude n°1, la stratégie thérapeutique avec les CSMs dans les traitements de l'insuffisance cardiaque post-infarctus représente une approche prometteuse qui permet d'améliorer la perfusion tissulaire mais le bénéfice fonctionnel reste largement sous-optimal. Une des causes principales est le taux bas de la intégration et la survie des CSMs injectées, car l'étude antérieure a montré que seulement 0,04% des CSMs survivaient et restaient sur place 4 jours après l'injection intramyocardique. Une raison possible pour expliquer l'échec de la intégration cellulaire est la disparité entre la culture cellulaire conventionnelle qui est réalisée en normoxie et la zone myocardique ciblée qui est gravement hypoxique. Cependant, l'hypoxie est connue comme un élément crucial pour maintenir la capacité d'auto-renouvellement, l'état undifférencié et la stabilité génétique des CSMs. L'objective de notre étude est d'explorer l'impact de la culture cellulaire en hypoxie à long terme sur leurs potentiels thérapeutiques.

Pour aborder cette étude, nous avons prélevé les CSMs de la moelle osseuse des rats (n=27) et leur cultivées en normoxie (21% O_2) ou en hypoxie (5% O_2) jusqu'à passage 4 (P4). Les tests de croissance cellulaire (le temps de doublement de la population, les *colony forming units-fibroblast (CFU-f)*), la cytométrie en flux, et l'assai Bio-Plex ont été effectués pour tester la prolifération, le phénotype et l'expression des cytokines des CSMs. En ce qui concerne l'étude *in vivo*, nous avons injecté des CSMs autologues à P3 cultivées en normoxie (n=6) ou en hypoxie (n=6) dans les rats ayant subi de la ligature coronaire 1 mois auparavant. L'impact de la thérapie cellulaire sur la perfusion myocardique et la performance hémodynamique était évalué par le ^{18}F-FDG TEP et le cathéter de conductance pression-volume, respectivement. Les examens histologiques étaient réalisés pour évaluer la densité de l'inflammation, la fibrose et la néovascularisation.

Notre étude a découvert que le préconditionnement à l'hypoxie renforce significativement le potentiel clonogénique et la prolifération sans modifier la capacité multipotente des CSMs. L'hypoxie change le spectre des cytokines exprimées par les CSMs sur les plans inflammatoire,

fibrotique et angiogénique. Nous avons trouvé une corrélation linéaire entre la production *in vitro* de cytokine *VEGF* et les nombres de néo-vaisseaux sur les coupes histologiques. ^{18}F-FDG TEP révélait une amélioration de la perfusion myocardique dans les groupes traités; cet effet était renforcé par le préconditionnement à l'hypoxie. Par contre, la TEP ainsi que le cathéter de conductance n'ont pas d'amélioration de la fonction ventriculaire au terme des paramètres de pression et de volume, et de la fraction d'éjection ; mais les paramètres volume-indépendants dérivés du cathéter de conductance par l'occlusion de la veine cave inférieure qui signifaient la contractilité intrinsèque étaient mieux conservés dans le groupe traité par les CSMs cultivées en hypoxie que celles en normoxie et le groupe de contrôle.

Pour conclure, notre étude soutient l'hypothèse que les CSMs cultivées en hypoxie s'adaptent mieux à l'environnement hypoxique de la cible thérapeutique par favoriser la prolifération, le potentiel multipotent et l'expression des cytokine réparatrices des CSMs. Leurs effets bénéfiques sur la perfusion myocardique et la contractilité intrinsèque s'effectuent probablement par la médiation de la modulation de l'inflammation et la promotion de l'angiogénèse.

Long-term hypoxic cell culture enables a higher therapeutic potential of rat bone marrow mesenchymal cells in the treatment of chronic myocardial infarction

Nguyen Tran[1,2,*,#], Yihua Liu[1,2,3,#], Aude Falanga[1], Vanessa Marie[1], Guillaume Gauchotte[4], Chloé Claussner[1], Sylvain Poussier[1], Frédérique Groubatch[1], Pierre-Yves Marie[2,5], and Pablo Maureira[1,2,3]

1) School of Surgery, Faculty of Medicine, University of Lorraine, France

2) INSERM U1116, Faculty of Medicine, University of Lorraine, France

3) Department of Cardiovascular Surgery, Nancy University Hospital, France

4) Department of Pathology, Nancy University Hospital, France

5) Nuclear Medicine Department, Nancy University Hospital, France

*, Corresponding author:

Dr Nguyen Tran, School of Surgery, Faculty of Medicine, University of Lorraine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Tel: +33(0) 3.83.68.33.91; Fax: +33(0)3.83.68.33.99;

Email: nguyen.tran@univ-lorraine.fr

Both #first authors contributed equally to this work.

Abstract

Background: The mismatch of normoxia/hypoxia cell conditioning with the targeted chronic hypoxic myocardial tissue could potentially hamper the therapeutic effects of implanted bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). This study sought to address (i) the extent of change to BMSC therapeutic potential in different normoxic/hypoxic preconditioning process and (ii) the effectiveness of this method for treating chronic myocardial infarction (MI) in rat hearts.

Methods: rat BMSCs were harvested and cultured in normoxic (21% O_2, n=27) or hypoxic conditions (5% O_2, n=27) until Passage 4 (P4). Proliferation, flow cytometry, and Bio-Plex assays were conducted to explore variations in the cell cycle, phenotype, and cytokine expression, respectively. In the *in vivo* set-up, P3-BMSCs cultured in normoxia (n=6) or hypoxia (n=6) were intramyocardially injected into rat hearts that had previously experienced 1-month-old MI. The impact of cell therapy on cardiac segmental viability and hemodynamic performance were assessed after 1 month by 2-Deoxy-2[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F-FDG) positron emission tomography (PET) imaging and pressure-volume catheter, respectively. Additional histomorphological examinations were conducted to evaluate inflammation, fibrosis, and neovascularization.

Results: Hypoxia preconditioning significantly enhanced rat BMSC clonogenic potential and proliferation without altering their multipotency. Different profiles of inflammatory, fibrotic, and angiogenic cytokine secretion were also documented, with a marked correlation observed between *in vitro* and *in vivo* proangiogenic cytokine expression and tissue neovessels. Hypoxic-preconditioned cells had a beneficial effect on the myocardial viability of infarct segments and intrinsic contractility.

Conclusion: Hypoxic-preconditioned BMSCs were able to benefit myocardial perfusion and contractility, probably by modulating the inflammation and promoting angiogenesis.

Key words: Hypoxic preconditioning, mesenchymal stem cells, chronic myocardial infarction, myocardial viability, angiogenesis

Introduction

Chronic ischemic heart failure continues to pose an unequivocal challenge to the health care systems around the world owing to the structural complexity of cardiac tissue, as well as the polymorphism of tissue degradation inherent to the chronic phase of myocardial infarction (MI) that are still refractory to conventional treatments [1, 2]. The process of cardiac healing following MI [3], especially in the chronic phase, are conceived to be a set of highly complex events in cell and molecular levels, including inflammatory response, collagen turnover and neovessel formation which are known to be crucial physio-pathological changes accounting for cardiac repair as well as ventricular remodeling. Recently, a cardiac tissue rehabilitation concept has been proposed, notably consisting of using bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) implanted directly into the infarct area to repair or reshape the highly hypoxic tissue [4, 5, 6]. The paracrine effects [7, 8, 9] including immuno-modulation and angiogenesis, instead of transdifferentiation into cardiomyocytes, are recognized as the main mechanism underlying cardiac repair with cell therapy. While early experimental studies and clinical trials have shown encouraging results, it cannot be denied that the reported therapeutic effects of BMSCs are largely suboptimal [10, 11].

The main causes for concern are the low engraftment and survival rates, since the literature reports that merely less than 1% of BMSCs typically survive for 4 days following transplantation [12]. One of the possible explanations for cell graft failure is related to the mismatch between conventional *in vitro* normoxic culture for cell expansion and the severely hypoxic infarct area that is targeted. Furthermore, the BMSCs niche has been found to be "physiologically" hypoxic [13]. This state is known to maintain the self-renewal capacity [14, 15], undifferentiated state [16, 17], and genetic stability of these cells [18]. It is now well accepted that the duration and the degree of hypoxia in cell expansion are critical parameters for maintaining the proliferation and differentiation capacities of BMSCs [19, 20, 21] and that changes in intrinsic potentialities might differently impact on therapeutic outcomes. However, the studies are still scarce regarding the therapeutic impacts of long-term hypoxia preconditioned BMSCs on chronic MI.

We designed this study with the aim of addressing the two following issues: (i) the extent of changes to biological characteristics of BMSCs under long-term (1 month) normoxic (O_2 21%)

or hypoxic (O_2 5%) culture and (ii) the impacts of such culture condition on the therapeutic potential in treating chronic MI. Cell growth tests (fibroblast Colony-Forming Units (CFU-f), and cell population-doubling time), flow cytometry and Bioplex assay were performed to evaluate the cell proliferation, phenotype, and expression of inflammatory, fibrotic and angiogenic cytokines. Impacts of cell therapy on cardiac segmental viability and hemodynamic performance were assessed 1 month following cell administration by means of original ^{18}F-FDG-PET imaging technique and pressure-volume catheter, respectively. Histomorphological examinations were performed in order to evaluate the tissue inflammation, fibrosis and neovascularization.

Material and methods

Animals

This study was conducted using Wistar rats (4-6 months old, with an initial body-weight of 350g–450g). All experimental procedures were in accordance with our local ethics committee and with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication no. 85-23, Revised 1996).

Anesthesia

For invasive surgical procedures and examinations, animal anesthesia was achieved by inhalation of isoflurane (2-3 vol%) and oxygen (2L/min) *via* tracheal intubation connected to mechanical ventilation (Minerve, Esternay, France).

BMSCs harvest and culture

As previously described [22], the bone marrow was harvested (n=27) through tibial puncture using a 28-gauge needle. The obtained bone marrow solution was centrifuged at 400g for 10 minutes. Cell pellets were resuspended in Eagle's minimal essential medium, MEM (Gibco, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 0.1 mmol.L^{-1} β-mercaptoethanol (Sigma, USA) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) (Gibco, USA). They were then cultivated in 25cm^2 flasks at 37℃ in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. On Day 4, the non-adherent cells were washed out with phosphate buffered

saline (PBS) and the adherent cells were further expanded until reaching 80% confluence. They were then passaged using 0.25% trypsin and expanded in 75 cm^2 flasks at a density of 6×10^3 cells per cm^2. From Passage 1 (P1), the BMSCs derived from each rat were divided into two groups, one cultivated in normoxic conditions (21% oxygen tension) and the other in hypoxic conditions (5% oxygen tension), until P4. For cell therapy, the BMSCs of both conditions were harvested at P3 and prepared for cell therapy.

Establishment and evaluation of myocardial infarction

At the same time as harvesting the bone marrow, myocardial infarction (MI) was induced in 27 animals by means of permanent coronary ligation, as previously described [23]. In brief, the hearts were accessed *via* left anterolateral thoracotomy through the fifth intercostal space. The left anterior descending artery was ligated by applying a 7/0 Prolene suture (Ethicon, Somerville, NJ). Analgesic agent, namely Lidocain (Panpharma, France), and antibiotics, Cefamendole (Panpharma, France) were administered intramuscularly after incision closure. The surgical successful rate was 67% (18/27).

One month following MI, an original ^{18}F-FDG-PET imaging technique [24] was performed in the rats to assess the infarct areas and the baseline LV function, using a dedicated small-animal PET system (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, USA). Quantitative analysis was performed using the 17-segment LV division method by means of QGS software. The segments with low mean myocardial FDG activity (< 70% of maximal voxel value) were defined as exhibiting infarct. The rats were divided equally into control group (n=6), normoxic group (n=6) and hypoxic group (n=6) according to their infarct area, each group receiving saline, BMSCs cultured in normoxia, or BMSCs cultured in hypoxia, respectively.

Cell characterization

The clonogenic potential of the BMSCs was assessed by counting the number of fibroblast colony-forming units (CFU-f) that has been stained with methylene blue and visualized by phase-contrast microscopy. The population-doubling time was calculated by taking a daily count of the cells in a Thoma counting chamber, and BMSC immunophenotype characterization was achieved by analyzing the surface markers of stem cells (CD34-, CD45-, CD44+ and CD90+) by means of flow cytometry (FACS Calibur™, Becton Dickinson).

Differentiation assays

The differentiation potential of BMSCs into adipocytes and osteocytes was evaluated as previously described [17]. In brief, BMSCs were cultivated in either normoxia or hypoxia until P2 then exposed to osteogenic or adipogenic lineage-specific media, for 21 days for adipocyte differentiation and 28 days for osteocyte. The differentiated cells were characterized by means of histology staining using Oil Red O for adipocytes and Alizarine red for osteocytes.

The evaluation of differentiation into chondrocytes was performed after pellet culture. The P2-BMSCs preconditioned with either normoxia or hypoxia were cultured in a 15mL polypropylene tube in chondrogenic lineage-specific media for 28 days. The pellets were fixated with incubation for 24h in Picric acid-Formalin solution. The differentiated cells were characterized by means of histology staining of the pellet slices, using Alcian blue and Kernechtrot dyes.

Cell therapy

One month following MI induction, the rats received an intra-myocardial injection of BMSCs cultivated in either normoxia or hypoxia, or physiological saline solution. The cells were conditioned in an insulin syringe ($2x10^6$ cells in 50 µL), and a single injection was administered *via* redo thoracotomy into the visually delineated fibrotic area of MI. One month after the BMSC implantation, another ^{18}F-FDG PET scan was performed to evaluate the impact of cell therapy on myocardial metabolism and function.

Left ventricle pressure-volume (P-V) conductance catheter

Four weeks following BMSC injection, the hemodynamic performance of all three groups‟ hearts was evaluated by means of P-V catheter (SPR-838, 2F, Millar Instruments Inc.). The hearts were accessed *via* the right carotid artery access. We categorized our finding as “steady state”, “hypertonic saline infusion”, and “inferior vena cava occlusion”, recorded and analyzed using the MPVS Ultra and Emka Technologies‟ Iox2 acquisition software (Millar Instruments Inc.).

Bio-Plex analysis

BMSC cytokine production and the cytokine levels in the infarct heart tissue were assessed by means of Bio-Plex analysis. Lysates taken from cultivated BMSCs and homogenates of heart tissue were prepared using a Bio-Plex cell lysis kit (Bio-Rad, France), and the extracted samples were analyzed with a multiplex rat cytokine assay (Bio-Plex Pro assays, Bio-Rad, France) in accordance with the manufacturer‟s instructions. The assessed parameters included tumor necrosis factor alpha (TNF-α), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Interleukin (IL)-6, IL-10, vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-β1).

Histo-morphological analysis

Following formalin fixation and paraffin-embedding, 5 µm sections of the heart tissues were stained with hematoxylin, eosin and saffron (HES) to evaluate the myocardial inflammatory infiltration and fibrosis. Myocardial inflammation was assessed by two pathologists blinded to this study, using the following semi-quantitative score according to the intensity of inflammatory cells infiltration: 0 for absence of inflammation; 1 for mild inflammation; 2 for moderate inflammation; 3 for severe inflammation. Picrosirius red staining was performed to assess the total collagen content by measuring red stained areas over the field area by means of Image J software (http://imagej.nih.gov/), as previously reported [25]. Immunohistochemical staining with anti-platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, or CD31) antibody was also performed to evaluate neovessel formation. Vascular density was evaluated by counting the number of PECAM-1-positive micro-vessels in the infarct area, applying consecutive high-power fields (0.237mm²).

Statistics

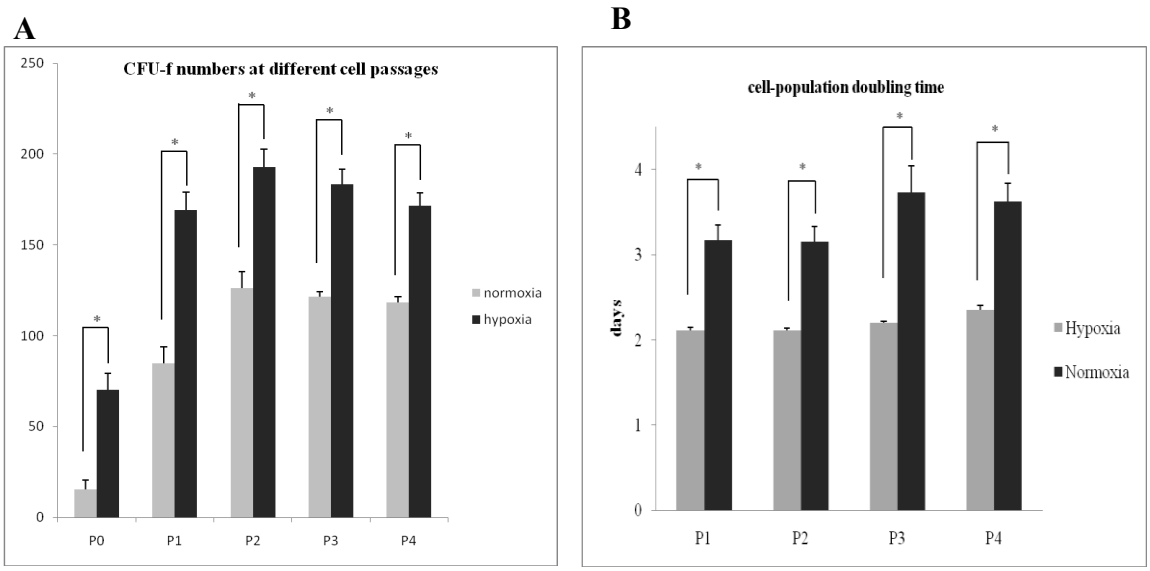
Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Comparisons between groups were achieved by means of unpaired Student‟s *t*-test, where appropriate. For ordinal data, such as the intensities of inflammation and infarcted segments, non-parametric Mann-Whitney U-test was used. A $p < 0.05$ was considered to denote statistical significance. Statistical analysis was performed using the SPSS software package V.16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

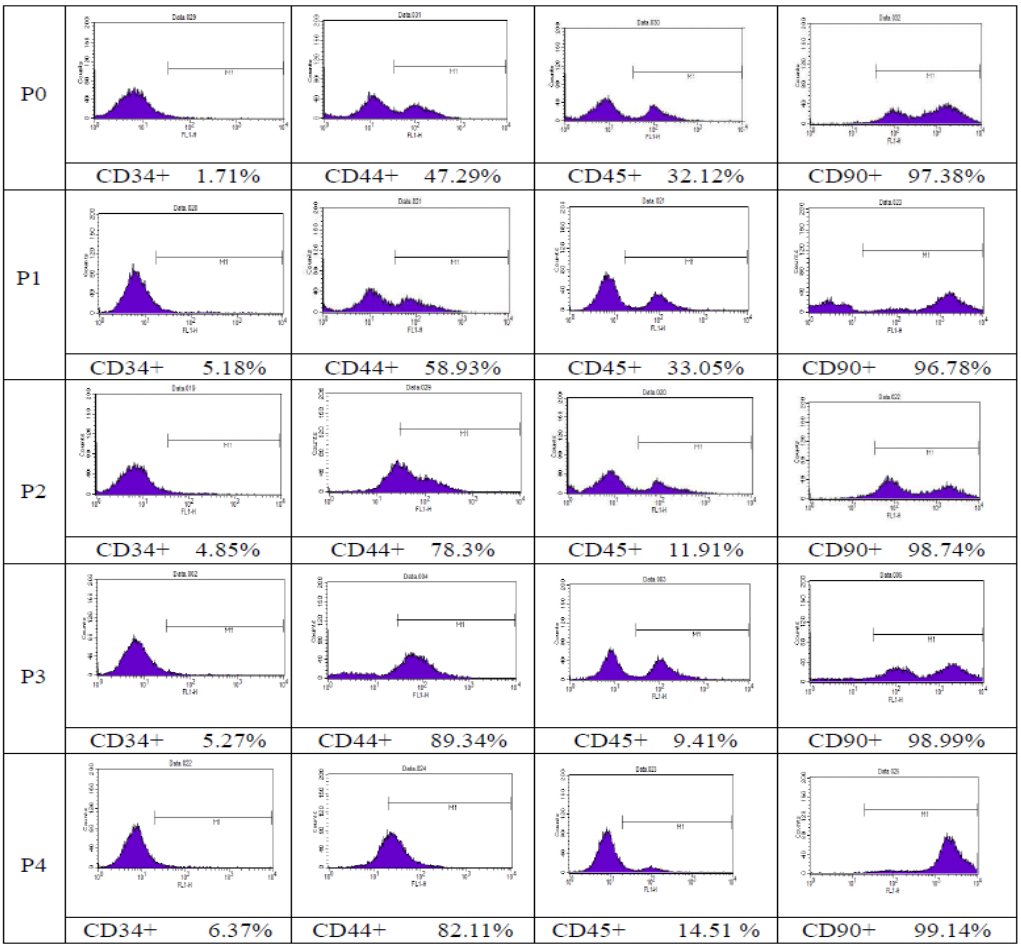
In vitro analysis of BMSCs growth and phenotype

As shown in **Figure 1A**, the clonogenic potential of BMSCs, evidenced by CFU-f assay in every cell passage, was strongly enhanced when cultured in hypoxia, compared with normoxia conditions (all p <0.05), while maximum clonogenicity was observed in P2 with both culture conditions. The BMSC proliferation (**Figure 1B**) rates were also benefited by the hypoxic conditions, with a cell doubling time of 2.11±0.15 days at P1 and 2.41±0.18 days at P4, whereas the cell doubling time in normoxic condition was 3.17±0.23 days at P1 and 3.64±0.28 days at P4, both p <0.01.

BMSC phenotype was assessed for each subculturing passage by analyzing the surface markers *via* flow cytometry (**Figure 1C, 1D**). Similar profiles of BMSC phenotype in each passage were documented in both culture conditions, with BMSCs being positive for CD90 (>95%) and for CD44 (>70%), negative for CD34 (<5%) and for CD45 (<7%) since P2.



C



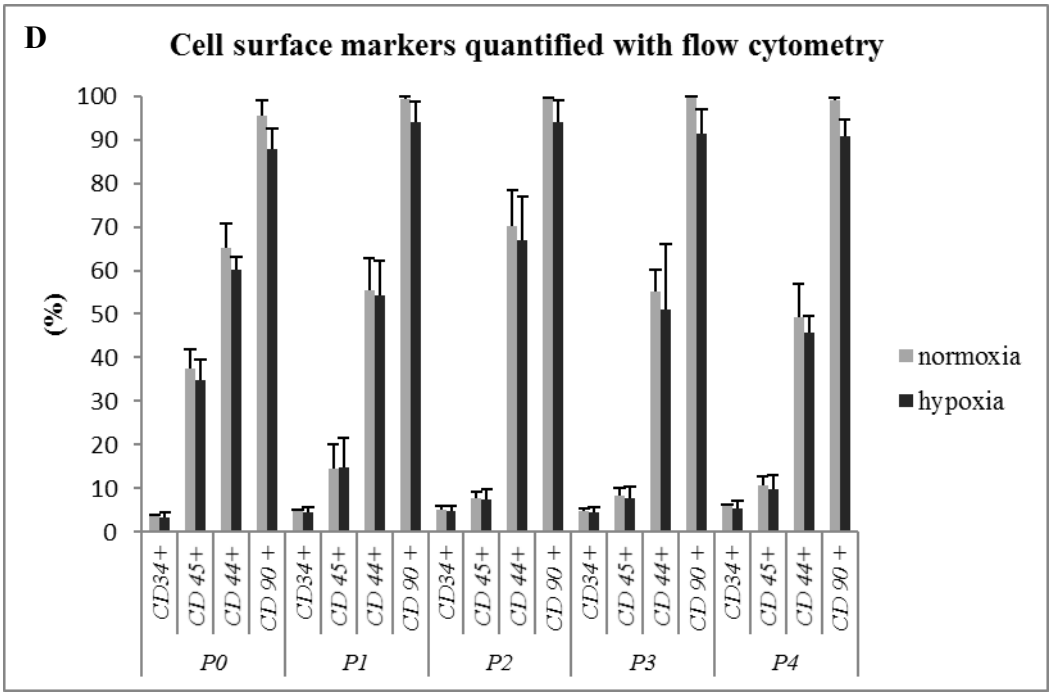
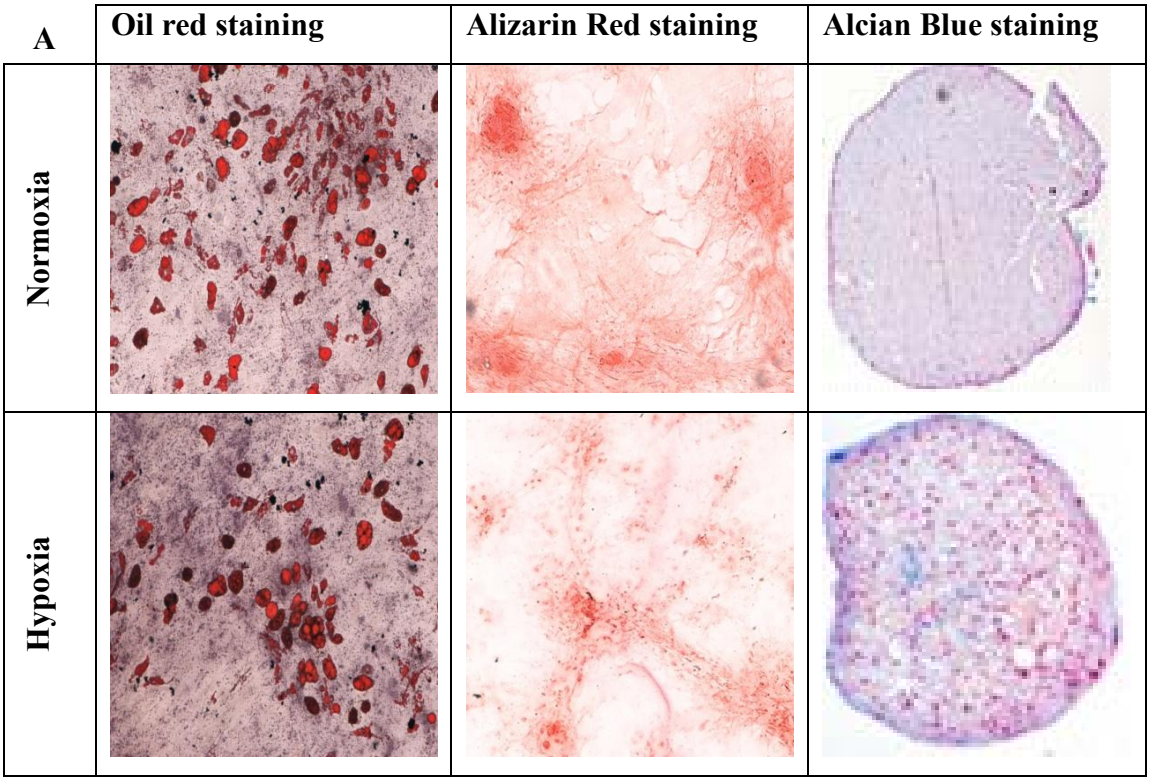


Figure 1. Cell proliferation and surface makersof BMSCs cultured in normoxic and hypoxic conditions. (A) CFU-f assay showed that the colony forming ability of BMSCs was enhanced in hypoxia. (B) The cell-population doubling time of BMSCs was significantly shorter when cultured in hypoxic condition. (C)

Representative flow cytometry images of BMSCs cultured in hypoxia indicated CD90 to be a predominant surface marker (>95%). (D) Flow cytometry revealed that rat BMSCs were characterized by CD34(-), CD45(-), CD44(+), and CD90(+), the immunophynotype remained stable during the first 4 passages and comparable in both culture conditions. * $p<0.05$

In vitro analysis of BMSC differentiation potential

We performed different staining techniques (Oil Red O, Alizarine red, and Alcian blue, **Figure 2**), which revealed that the differentiation rates of the BMSCs into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes were 47.2±6.8%, 86.3±8.2%, and 17.0±3.7%, respectively, in normoxic condition. This differed from those in hypoxic condition: 26.2±4.8%, 31.3±4.1%, and 43.0±3.0%, respectively (all p <0.05), indicating that hypoxia might have a more favorable influence on BMSC differentiation into chondrocytes, whereas normoxia promoted BMSC differentiation into osteocytes and adipocytes.



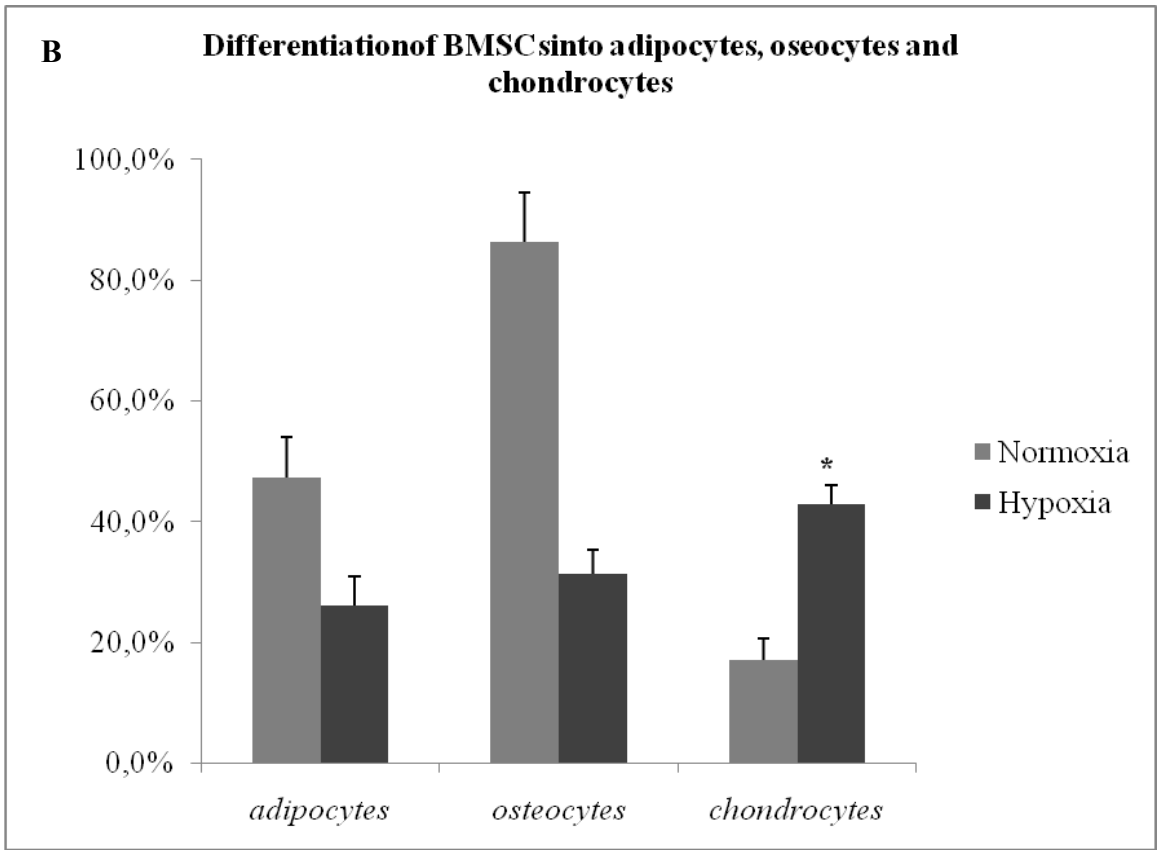


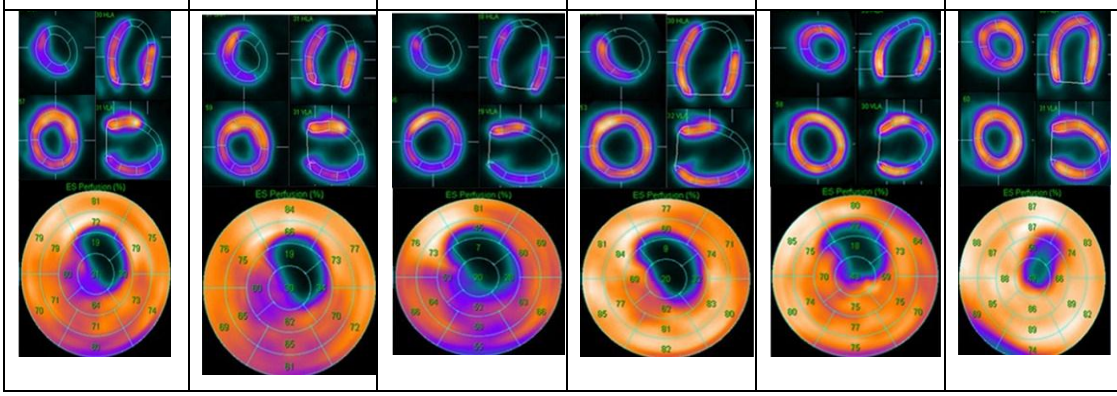
Figure 2. (A) Images illustrated the varied differentiation potential of BMSCs into adipocytes, osteocytes and chondrocytes demonstrated by Oil Red staining, Alizarin Red staining and Alcian Blue staining, respectively. (B)The differentiation into adipocytes and osteocytes was favored by normoxia, while the differentiation into chondrocytes was favored by hypoxia. *, p <0.05 compared to Normoxia group.

^{18}F-FDG PET

As shown in **Figure 3A**, pre-therapeutic PET imaging revealed comparable cardiac functional impairment and infarct area in all three groups. Following BMSC injection, an improvement in FDG uptake (**Figure 3B**) in the infarct zone was observed in both the normoxia (+3±3.2%) and hypoxia groups (+5±5.8%), while the control group demonstrated no improvement (-1±3.5%). A similar change was observed in the reduction of infarct area (**Figure 3C**) by -0.2±1.2, 0.6±1.0 and 1.5±1.0 segments in the control, normoxia, and hypoxia groups, respectively. However, these beneficial structural changes appeared to have no link to cardiac functional improvement, since the PET exams demonstrated no difference in left ventricular ejection fraction (**Figure 3D**) either between groups, or between pre- and post-BMSC administration.

A

Control group		Normoxia group		Hypoxia group	
Before BMSCs injection	After BMSCs injection	Before BMSCs injection	After BMSCs injection	Before BMSCs injection	After BMSCs injection



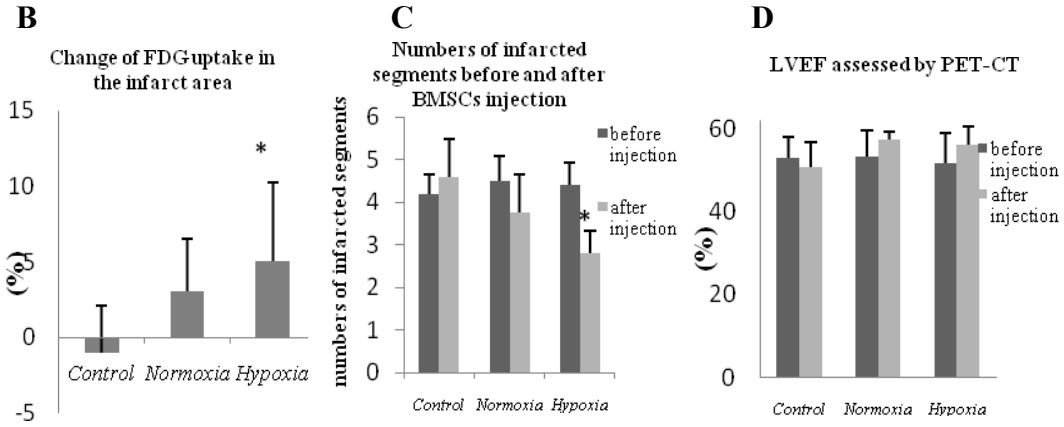


Figure 4. (A) Images illustrating the different therapeutic effects (improvement of FDG uptake in the infarct zone and reduction of infarct area) following BMSC injection in all three groups. The improvement of FDG uptake in the infarct zone (B) and the reduction of infarct area (C) and was significantly enhanced in the hypoxia group, compared to the control group; while the differences between the normoxia group and the control group were not statistically significant. However, the left ventricular ejection fraction (D) was not significant different between groups, nor did it differ between pre- and post-BMSC administration. *, p <0.05 compared to the control group at the same time point; #, p <0.05 compared to before BMSC administration.

Pressure-volume catheter

Table 1 presents the hemodynamic parameters assessed by means of pressure-volume catheter in all three groups. In contrast to control group, the normoxia and hypoxia groups demonstrated a trend of improvement in several volume-dependent parameters, such as ejection fraction,

cardiac output and stroke work (p >0.05). However, the volume-independent parameters signifying the intrinsic contractility obtained with vena cave inferior occlusion (dP/dT_{max}.EDV, PRSW) were significantly best preserved in the hypoxia group out of the three.

Table 1. Hemodynamic parameters obtained with Pressure-Volume catheter

Parameters	Control group	Normoxia group	Hypoxia group
HR (/bpm)	265.8± 22.1	258.8±29.5	262±11.3
CO (mL/min)	37.4±11.4	48.5±17.6	54.7±17.9
EF (%)	52.8±6.8	56.8±3.9	58.3±6.2
dP/dT_{max} (mmHg/s)	4598.2±1784.4	5474±864.3	5709.6±1130.0
$-dP/dT_{min}$ (mmHg/s)	-3590.6±1477. 3	-4341.5±112.1	-4528.6±891.4
SW (mmHg.mL)	10341±4042.1	12153±3776.3	14787.8±3950
E_{max}	2.6±0.8	3.3±1.4	3.6± 1.1
dP/dT_{max}.EDV (mmHg/s.μL)	29.8±6.6	37.3±9.5	65.1±15.1 * #
PRSW (mmHg)	45.9±17.4	66.4±26.6	73.8±25.5 *

HR, heart rates; CO, cardiac output; EF, ejection fraction; dP/dT_{max} , peak rate of pressure rise; $-dP/dT_{min}$, peak rate of pressure decline; SW, stroke work; E_{max}, arterial elastance; PRSW, pre-load recruited stroke work. *, p <0.05 compared with control group; #, p <0.05 compared with Normoxia group.

Cytokines production

Bio-Plex assay demonstrated oxygen tension in the culture medium to have a profound impact of on BMSC production of cytokines (**Figure 4**). Compared to normoxic culture, hypoxic culture significantly inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines TNF-α and GM-CSF, and pro-fibrotic cytokine TGF-β1, as well as promoting the production of anti-inflammatory cytokine IL-6 and angiogenic cytokine VEGF (all p <0.05). A trend was seen in the production of another anti-inflammatory cytokine IL-10, increasing in hypoxic culture, though the difference was not significant between two conditions. In *in vivo* set-up, similar changes in heart tissue cytokine expressions were documented in normoxia and hypoxia groups when compared to control group, with increased GM-CSF and VEGF expression, and decreased TNF-α, TGF-β1 and IL-6 expression. The expression of TGF-β1 was significantly higher in hypoxia group than normoxia group; however, no significant difference was evidenced in other cytokine expression between two groups.

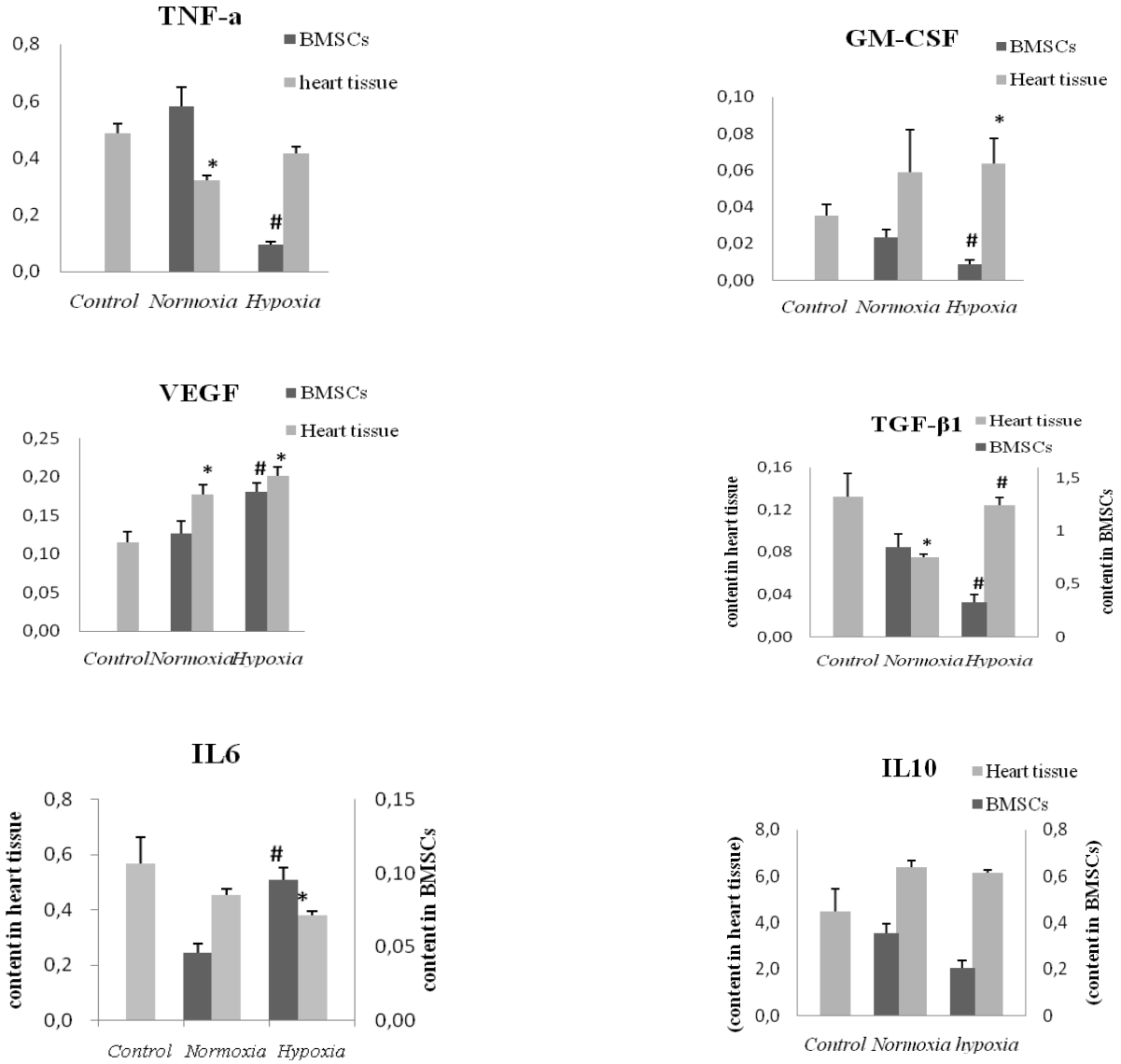
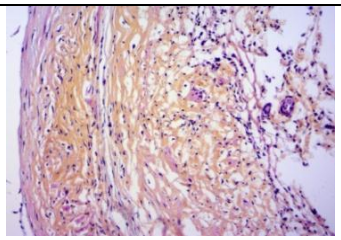
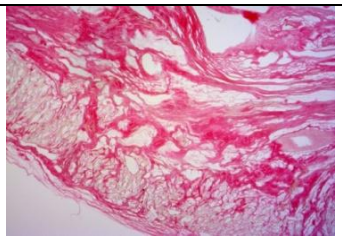
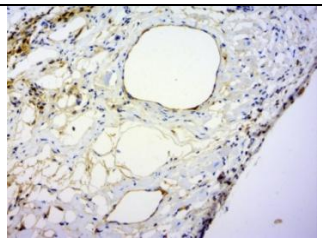
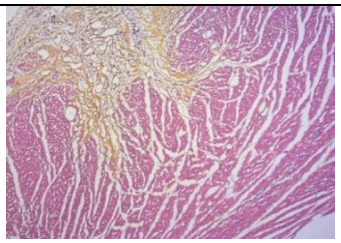
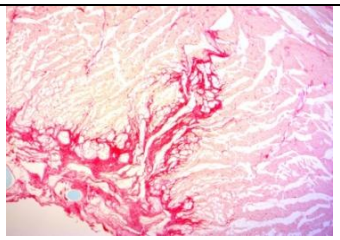
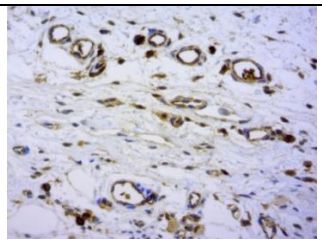
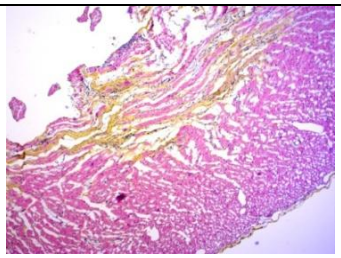
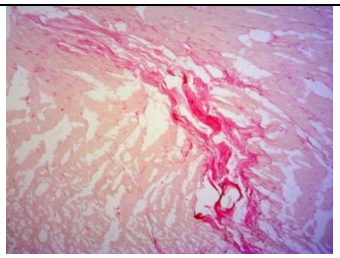
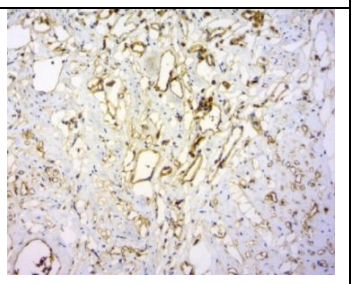


Figure 5. Bio-Plex assay revealing the different cytokine expression spectrum in BMSCs cultured in normoxia and hypoxia, and in heart tissue. TNF, tumor necrosis factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; TGF, transforming growth factor; IL, interleukine; VEGF, vascular endothelial growth factor. *, p <0.05, compared to the control group; #, p <0.05, compared to the normoxia group. The unit for the Ordinates is μg/mg of total protein.

Histomorphometry and immunohistochemistry

As demonstrated by **Figure 5**, HES staining revealed less interstitial inflammatory cell infiltration in the normoxia (1.2±0.7, [0, 2]) and hypoxia (1.0±0.7, [0, 1]) groups compared to

the control group (1.5±1.2, [0, 3]), yet the difference was not significant among them. Picrosirius Red staining demonstrated that intramyocardial injection of BMSCs was associated with a reduction in the total collagen content which was 8.4±4.5%, 5.1±3.1% and 3.1±1.6% in control, normoxia and hypoxia groups, respectively (p <0.05). Neovessel numbers revealed by CD31 antibody staining were 5.0±0.8, 8.1±3.1 and 13.8±3.6 in control, normoxia and hypoxia groups, respectively (p <0.05). A linear correlation was observed between the neovessel formation and the VEGF levels in the BMSCs (r=0.84, p< 0.05), as well as those in heart tissues (r=0.79, p <0.05).

	HES staining	**Picrosirius staining**	**CD31 antibody staining**
A Control			
Normoxia			
Hypoxia			

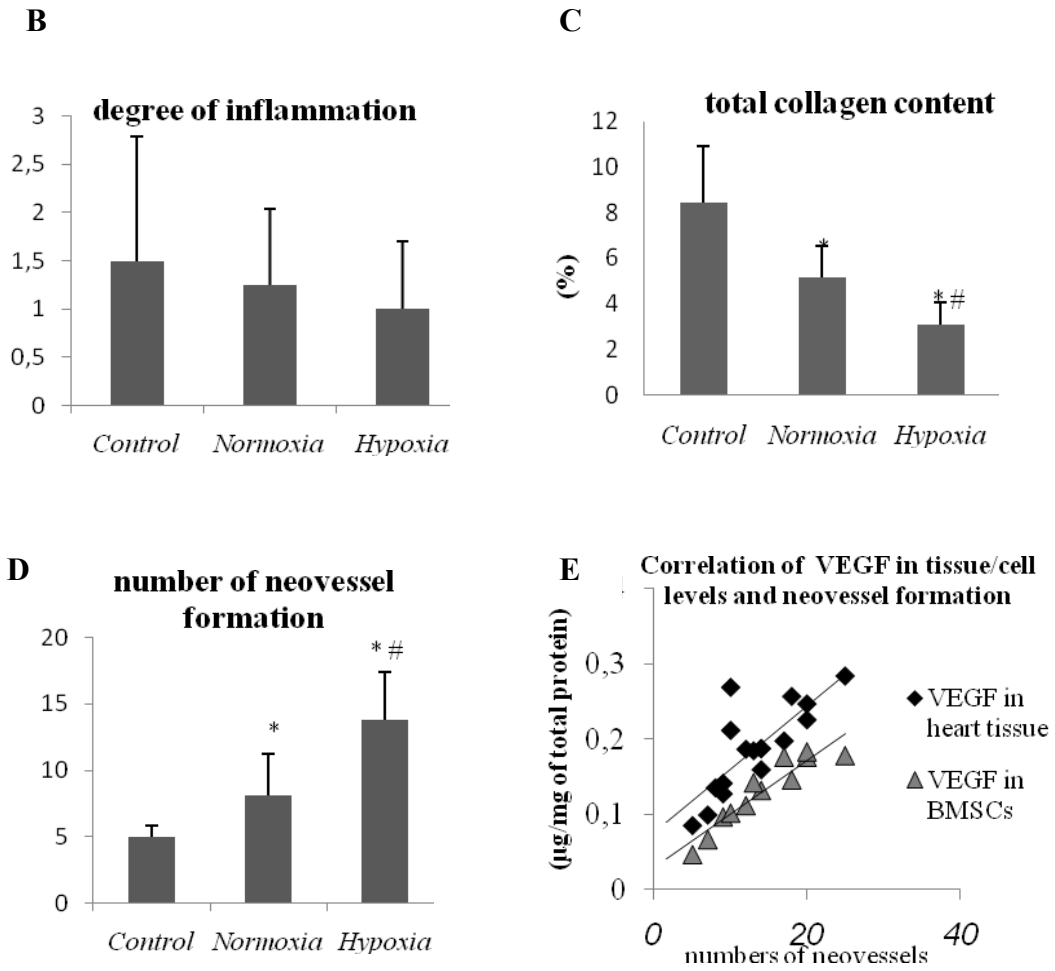


Figure 3. (A) Histomorphometric exams with Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) staining, Picrosirius Red staining and CD31 antibody staining for the assessment of inflammatory infiltration as well as the extent of fibrosis, total collagen coontent, and neovessel formation, respectively. (B) Compared with control group, normoxia and hypoxia groups showed a trend of decreased inflammation, but the differences between groups were not significant. However, the reduction of myocardial fibrosis (C) and neovascularization (D) were significantly favored by intramyocardial injection of BMSCs, especially when cultured in hypoxia. (E) There was a linear correlation between VEGF concentrations and neovessel formation, in both tissue level ($r=0.79$) and cell level ($r=0.84$). *, $p<0.05$ compared with the control group; #, $p<0.05$ compared with the normoxia group.

Discussion

In chronic MI, particularly when transmural necrosis is involved, focal inflammatory responses, massive fibrotic ongoing processes, an inexorable loss of contractile cells and angiogenesis occur, inducing profound secondary lesion enlargement, reducing contractility, and negatively impacting clinical outcomes. By combining *in vitro* and *in vivo* multimodal evaluation, the principal findings of the current study were that one month hypoxia culture of rat BMSCs (i) significantly enhanced these cells‟ clonogenic potential and proliferation without inducing changes in their multipotency; and (ii) improved myocardial viability and contractility probably by modulating immune/inflammation status and promoting angiogenesis.

In line with previous publications [17, 20], our study demonstrated that hypoxic culture of BMSCs, compared to normoxic culture, vastly accelerated *in vitro* cell proliferation, with increased fibroblast colony-forming units and decreased population-doubling time. The cell phenotype and surface markers remained stable in each passage, and were comparable between the two culture conditions, signifying that cell stemness, namely the self-renewal and multipotency, was well preserved. We believe that conducting permanent hypoxic culture instead of transient hypoxic preconditioning represents a more favorable condition for BMSC *in vitro* expansion and selection. One of the rationales for using hypoxic culture is that the mesenchymal stem cell niche is low in O2 concentration, and *in vitro* expansion under “physiological” hypoxia helps reduce the oxidative stress and decrease the production of reactive oxygen species by suppressing mitochondrial respiration [26]. Moreover, the harsh microenvironment in the infarcted zone represents an obstacle for cell-based cardiac repair: the ongoing inflammation, deleterious oxidative stress, and lack of oxygen and nutrients impede the engraftment and survival of BMSCs. *In vitro* hypoxic culture could enhance their anaerobic metabolic activity and capacity to adapt to a hostile microenvironment, thus potentially improves the BMSC survival after implantation, and further enhances their therapeutic potentials [27, 28].

Our study further illustrated that hypoxic culture of BMSCs could modify the expression of cytokines in such a way as to promote modulation in inflammatory and in fibrosis process. As the Bio-Plex assay revealed, BMSCs cultured in hypoxia, compared to those cultured in normoxia, released significantly less pro-inflammatory cytokines (TNF-α, GM-CSF), more

anti-inflammatory cytokines (IL-6, IL-10), and less pro-fibrotic cytokine (TGF-β1). Of particular interest, our data confirmed that hypoxic condition potentiated the production VEGF as it was also witnessed elsewhere [29, 30, 31]. However, the inflammation network and cytokine cascades in myocardial infarction might, in fact, elaborate temporally and spatially in a complicated and dynamic pattern [32]. This might render very challenging any illustration of the precise mechanisms underlying the beneficial changes of cytokine expression provided by *in situ* interaction between engrafted cells (cultured in hypoxia or not) and native hypoxic tissues. Indeed, in chronic MI, profound changes in ventricular architecture as well as dense collagen deposition might then represent a serious obstacle.

The dynamic inflammatory response and cytokine elaboration following myocardial infarction are reported to be highly significant in the healing process as well as in the detrimental ventricular remodeling. Previous studies have therefore demonstrated that mechanisms mediating cell-based cardiac repair might involve immunomodulation and anti-inflammatory pathways [33]. In our experiment, our *in vivo* data provided more complex patterns for tissue"s cytokine variations than that observed in *in vitro* set-up. In hypoxia group, the balance of expression of GM-CSF/IL-6 seemed to indicate a modulation of inflammation (down regulation of tissue IL-6) in keeping with an upregulated immunomodulator cytokine GM-CSF. On the other hand, expression of VEGF and TGF-β1 was also upregulated. Recently, there was a growing body of evidence involving VEGF and TGF-β1 and their regulation though respectively PI3K/Akt and TGF-β/SMAD2 pathways in the wound healing process *i.e.* modulation in collagen expression of cardiac fibroblasts [34].

Another main finding that emanated from our study was that long-term hypoxic preconditioned BMSCs produced marked increase in tissue viability and in cardiac function compared to their counterpart raised in conventional normoxic medium. The beneficial effect of BMSCs in chronic myocardial infarct areas was somewhat expected as we have already shown in our previous investigation. Indeed, outcomes from our groups in not only preclinical [22] but also in clinical setup [24] have demonstrated that (i) enhancing viability was one key role of cell therapy in chronic MI, and (ii) when associated with coronary artery bypass graft procedures, cell therapy was able to boost the myocardial perfusion and regained intermediate viability in the MI areas, indicating the importance of angiogenic mechanism. In this study, segmental

viability was higher when MI segments were treated with hypoxic preconditioned BMSCs. In addition, we found that among the growth factors and cytokines produced by hypoxic BM-MSCs, VEGF was perhaps the most relevant to the MI repair since a strong correlation could be found between the levels of *in vitro/in vivo* VEGF production and the quantity of neovessel formation in the infarcted zone, revealed by immunohistochemical findings. Thus, it is noteworthy that other works have also documented that hypoxia promoted changes in glucose metabolism of MSCs [35] and the latter observation could support the enhancement of FDG uptake evidenced here. Taken together, since hypoxia is an important stimulus promoting the secretion of VEGF; our data here underlines that VEGF-mediated angiogenesis might be one of the underlying mechanisms of BMSC-based cardiac repair, through which BMSCs cultured in hypoxia, rather than normoxia, are associated with better therapeutic effects.

According to Millar cardiac catheter examination, although there was a trend toward an improvement in both normoxia- and hypoxia-BMSC treated animals, there were no significant differences in EF, dP/dtmax, dP/dtmin, SW, and Emax when compared to vehicle group. In contrast, a clear improvement in load-independent parameters of LV performance was documented with dP/dTmax.EDV and with PRSW in animals that experienced intramyocardial implantation of hypoxic preconditioned BMSCs. According to our experience with regard to the management of chronic MI, it is very difficult, albeit this is the ultimate goal, to significantly reverse myocardial functional impairments. As it was also demonstrated in our previous studies, except in case of intermediate infarction where a residual metabolism still persisted, marked myocardial perfusion and/or viability were accompanied by a modest improvement in global function [24].

However, the exact mechanism of improvement of tissue viability, perfusion and architecture induced by close interaction between hypoxic selected cells and hypoxic MI environment was not completely clear-cut herein. We hypothesize, in keeping with the positive outcomes from implanted cells on fibrosis, on infarct size and on neoangiogenesis, that such tissue characteristics in cytokines might (i) influence further wound healing process of MI tissue and (ii) improve the contractile components of MI hearts. However, our study holds several limitations. We did not perform cell tracking procedures so that survival rates and direct role of engrafted cells in repair process were not available. We have developed an isotopic labelling

that allowed cell follow-up *in vivo* but it was efficient only for a very short period, *i.e.* 7 days [23]. Long-term cell tracking is still a challenging technique that requires both development and careful examination.

In conclusion, our results were reported to be strongly supportive of the hypothesis that matching the environment in cell therapy, *i.e.* conducting long-term preconditioning or selection of BMSCs in low oxygen tension conditions resembling those observed in the chronic infarct area, might favor the cooperative activity of specific cytokines and may enhance the cardioprotective/reparative role of these BMSCs when implanted in chronic hypoxic MI. The observed beneficial impact on myocardial perfusion and contractility can potentially be ascribed to pathways involving the modulation of tissue inflammation and promotion of angiogenesis.

References

[1] Schoenfeld M, Frishman WH, Leri A, Kajstura J, Anversa P. The existence of myocardial repair: mechanistic insights and enhancements. Cardiol Rev 2013; 21(3): 111-20.

[2] Doppler SA, Deutsch MA, Lange R, Krane M. Cardiac regeneration: current therapies-future concepts. J Thorac Dis 2013 ; 5(5) : 683-97.

[3] Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. Pharmacological research 2008; 58: 88-111.

[4] Dubois C, Liu X, Claus P, et al. Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascular after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2010; 55(20): 2232-43.

[5] Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. Cir Res 2011; 109(8): 923-40.

[6] Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Ashraf M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. J Mol Cell Cardiol 2007; 42(2): 441-8.

[7] Nascimento DS, Mosqueira D, Sousa LM, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. Stem Cell Research & Therapy 2014; 5:5.

[8] Duran JM, Makarewich CA, Sharp TE, et al. Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms. Circ Res 2013; 113:539-52.

[9] Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. Circ Res 2006; 98: 1414-21.

[10] Leri A, anversa P. Stem cells bone-marrow-derived cells and heart failure-the debate goes on. Nat Rev 2013; 10(7): 372-373.

[11] Rosen MR, Myerburg RJ, Francis DP, Cole GD, Marban E. Translating stem cell research to cardiac disease therapies. J Am Coll Cardiol 2014; 64: 922-37.

[12] Tsai CC, Yew TL, Yang DC, Huang WH, Hung SC. Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. Am J Blood Res 2012; 2(3):148-59.

[13] Mohyeldin A, Garzon-Muvidi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology : A critical component of stem cell niche. Cell stem cell 2010; 7: 150-7.

[14] Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. Int J Mol Sci 2013; 14: 2119-34.

[15] Pourrajab F, forouzannia SK, Tabatabaee SA. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. International journal of cardiology 2013; 163: 125-31.

[16] Cicione C, Muinos-Lopez E, hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Diaz-Prado S, Blanco F. Effects of severe hypoxia on bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential. Stem cells international 2013; 232896.

[17] Basciano L, Nemos C, Foliguet B, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. BMC cell biology 2011; 12:12.

[18] Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. Scientific world journal 2013:632972.

[19] Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. Stem Cell Research & Therapy 2012; 3: 9.

[20] Meretoja VV, Dahlin RL, Wright S, Kasper FK, Mikos AG. The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. Biomaterails 2013; 34: 4266-73.

[21] Boyette LB, Creasey OA, Guzik L, Lozito T, Tuan RS. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditionning. Stem cells

translational medicine 2014; 3: 241-54.

[22] Tran N, Franken PR, Maskali F, et al. 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. J Nucl Med 2007; 48(3): 405-12.

[23] Tran N, Maskali F, Antunes L, et al. Short-term retention and distribution of intramyocardial delivered mesenchymal cells within necrotic or intact myocardium. Cell transplant 2006; 15(4): 351-8.

[24] Maureira P, Marie PY, Liu Y, et al. Sustained therapeutic perfusion outside transplanted sites in chronic myocardial infarction after stem cell transplantation. Int J Cardiovasc Imaging 2013; 29(4): 809-17.

[25] Hadi AM, Mouchaers KT, Schalij I, et al. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. Cell oncol 2011; 34:343-54.

[26] Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. PLoS ONE 2013; 8(10): e77077.

[27] Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Stem cells 2008; 26(8): 2173-82.

[28] Tang YL, Zhu WQ, Cheng M, et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor-cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. Circ Res 2009. 104(10): 1209-16.

[29] Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. Journal of translational medicine 2014; 12:260.

[30] Saparov A, Chen CW, Beckman SA, Wang Y, Huard J. The role of antioxidation and immunomodulation in postnatal multipotent stem cell-mediated cardiac repair. Int J Mol Sci 2013; 14: 16258-79.

[31] Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, Lee T. Vascular endothelial growth factor as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. Biochemical and biophysical research communications 2009; 390: 834-8.

[32] Nian M, Lee P, Khaper N, et al. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. Circ Res.2004; 94: 1543-53.

[33] Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Ashraf M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. J Mol Cell Cardiol 2007; 42(2): 441-8.

[34] Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived

mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF-β/SMAD2 and PI3K/Akt pathways. Int J Mol Sci. 2014; 15(1): 605-28.

[35] Miyamoto M, Kuroda S, Zhao S, et al. Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats: a serial 18F-FDG PET study. J Nucl Med. 2013; 54(1): 145-50.

3.3 Etude n°3. L'impact de la décharge ventriculaire chronique sur le remodelage myocardique : l'évaluation multimodale de deux techniques de transplantation hétérotopique chez le rat

Résume :

Au cours des dernières années, la stratégie thérapeutique fondée sur la correction de la surcharge ventriculaire est devenue un sujet intéressant pour les chercheurs. Les résultats cliniques prometteurs ont été rapportés concernant la récupération fonctionnelle sous les dispositifs d'assistance ventriculaire (DAVs). Les mécanismes exactes restent inconnus. Il est généralement accepté que les bénéfices de la décharge mécanique du cœur sont dues à la régression de l'hypertrophie des cardiomyocytes, la régulation à la hausse des récepteurs β-adrénergiques et des protéines sarcomériques, et la normalisation de l'environnement neuro-hormonal.

Cependant, la récupération fonctionnelle soutenue permettant le sevrage des DAVs sans récidive reste un phénomène rare. En plus, les études cliniques comme pré-cliniques ont montré que la décharge ventriculaire de longue durée peuvent provoquer une atrophie myocardique qui est défavorable pour le remodelage inverse. Ces observations soulèvent les questions s'il y a une limite au terme de la durée et de l'intensité de décharge ventriculaire pour éviter leurs effets secondaires. Oriyanhan *et al* ont proposé que la durée optimale de décharge mécanique pour le remodelage inverse est 4 mois. Par contre, l'impact de l'intensité de la décharge sur la contractilité myocardique et le renouvellement de la matrice extracellulaire reste controversé.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux modèles de transplantation cardiaque hétérotopique, c'est-à-dire, transplantation cardiaque (n=15) et transplantation cœur-poumon (n=10), pour simuler la décharge complète et la décharge partielle, respectivement. Nous avons étudié les rôles de décharge avec intensité différente sur la morphologie, la contractilité et le métabolisme du glucose des greffons par échocardiographie, ^{18}F-FDG TEP et le cathéter de conductance pression-volume, respectivement. L'évaluation histomorphométrique et l'analyse biochimie ont été également conduit pour évaluer les effets de décharge ventriculaire sur certains processus biologiques tels que l'inflammation, la lésion ischémique et la dégradation des

collagènes qui sont engagés dans le remodelage cardiaque.

Les données échocardiographiques montraient une atrophie progressive sans altération de la fraction d'éjection des greffons au cours de 4 semaines. Le groupe avec décharge complète présentait une atrophie plus importante que le groupe avec décharge partielle. La ^{18}F-FDG TEP révélait une diminution important (de 80-90%) d métabolisme du glucose chez les greffons que chez les cœurs orthotopiques ; les greffons complètement déchargés présentaient une diminution métabolique plus importante que les greffons partiellement déchargés. A l'aide de cathéter de conductance pression-volume, nous avons trouvé que la contractilité est mieux préservée aux greffons avec la décharge partielle que ceux avec la décharge complète. Les examens histologiques révélaient une diminution des poids humides, une diminution de la taille des cardiomyocytes et une augmentation de la concentration des collagènes aux greffons par rapport aux cœurs orthotopiques, et ces modifications étaient plus importantes aux greffons avec décharge complète que ceux avec décharge partielle. Pourtant, l'analyse biologique moléculaire n'a pas trouvé de différence significative en expression des cytokines inflammatoires et angiogéniques, ainsi que l'expression des enzymes impliquées dans le renouvellement des collagènes (MMP-2, MMP-9).

Notre étude confirme que la décharge volumique entraine un remodelage cardiaque d'un cœur normal, y compris l'atrophie du myocarde, la fibrose interstitielle, et la diminution de travail mécanique et le métabolisme du glucose. L'atrophie du myocarde est la conséquence directe et visible de la décharge mécanique, qui augmente la proportion des collagènes totaux, et est responsable de la dysfonction diastolique et systolique. Comparé à la décharge complète, la décharge partielle est associée à une atrophie cardiaque et une diminution de métabolisme du glucose moins importantes, et une contractilité mieux préservée.

Impact of chronic left ventricular unloading on myocardial remodeling: multimodal assessment of two heterotopic heart transplantation techniques

Yihua LIU, MD[1,2,3], Pablo MAUREIRA, MD, PhD[1,2,*], Guillaume Gauchotte, MD, PhD[4], Aude FALANGA, MSc[2], Vanessa MARIE, MSc[2], Arnauld OLIVIER, MD[6], Frederique Groubatch, MSc[2], Celine Gu, MD[5], Pierre-Yves MARIE, MD, PhD[2,5] and Nguyen TRAN, MD, PhD[2]

1. Department of cardiovascular surgery and heart transplantation, CHU-Nancy, F-54000 France

2. School of surgery, Unité INSERM 1116, Université de Lorraine, Nancy, F-54000 France

3. Department of cardiothoracic surgery, Zhongnan hospital of Wuhan University, Wuhan, 430071, China

4. Department of pathology, CHU-Nancy, F-54000 France

5. Department of medical imaging, CHU-Nancy, F-54000 France

6. Department of cardiology, CHU-Nancy, F-54000 France

*Corresponding author: Pablo MAUREIRA

1, Allée du Morvan, F-54500, Vandoeuvre-lès-Nancy

Email: pablomaureira@hotmail.com

Tel: +33(0)383154300

Fax: +33(0)383154954

Background: Cardiac recovery is possible by means of mechanical unloading, yet remains rare. Excessive unloading associated myocardial atrophy and fibrosis may adversely affect the process of reverse remodeling. In this study, we sought to evaluate the impact of different intensities of chronic left ventricular (LV) unloading on myocardial remodeling.

Methods: We subjected 25 isogenic Lewis rats to either complete LV unloading (CU, n=15) induced by heterotopic heart transplantation, or partial LV unloading (PU, n=10) by heterotopic heart-lung transplantation. Serial echocardiography, ^{18}FDG-PET and LV pressure-volume catheter were performed to evaluate the morphology, glucose metabolism and hemodynamic performance of the orthotopic hearts and heterotopic transplants over 4 weeks. Cell size, collagen content, tissue cytokines (IL-1α, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, and VEGF), and matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 were also determined.

Results: We demonstrated an LV load-dependent relationship using echo-based structural (LPWT, IVSD and LVDd) and functional (LVFS and LVEF) parameters, as well as an ^{18}FDG uptake (all $p<0.05$). This load-dependent relationship was also evidenced in P-V conductance catheter‟s measurements (SV, SW, CO, dP/dTmax, and -dP/dTmin, all $p<0.05$). Significant myocardial atrophy and fibrosis were observed in unloaded hearts, while the cytokines and MMPs concentrations were comparable in both unloading conditions.

Conclusion: Partial and complete unloading were found to impact the remodeling of non failing hearts in a rodent model to different extents on myocardial atrophy, fibrosis, glucose metabolism and mechanical work. Cardiac atrophy is the prominent change following mechanical unloading, which exaggerates the proportion of total collagen that is responsible for diastolic dysfunction.

Key words: heterotopic heart transplantation; cardiac remodeling; atrophy; conductance catheter; glucose metabolism

Introduction

Heart failure is characterized by an alteration in ventricular geometry and impaired cardiac function (ventricular remodeling) secondary to myocardial injurious events of various etiologies, including acute and chronic ischemia, exposure to toxins, genetic abnormalities, infectious agents, and cardiac pressure/volume overload [1]. Over the past few years, there has been increased interest in the therapeutic strategy involving reducing left ventricle (LV) overload while preserving ventricular contractility [2, 3]. Promising clinical outcomes have been reported with regard to cardiac recovery under ventricular assist devices (VADs) [2, 3]. Although the mechanistic details are still being refined, the benefit of mechanical unloading can to some extent be ascribed to the regression of myocytes hypertrophy, up-regulation of β-adrenergic receptors and sarcomeric proteins, improved calcium handling, and normalization of the neurohormonal environment [4, 5].

However, sustained myocardial recovery that allows for the removal of LVAD without recurrence is, however, a rare phenomenon [6], with clinical and experimental studies having indicated that long-term LV unloading might trigger myocardial atrophy that is detrimental to cardiac recovery [7, 8]. These observations have brought into question whether there is a limit in terms of the duration and intensity of ventricular unloading before having a detrimental effect on efficient reverse remodeling. Oriyanhan *et al.* [8] conducted a study that suggested the optimal duration of mechanical unloading for improving myocardial recovery to be 4 weeks; The impact of different unloading levels on myocardial contractility and extracellular matrix turnover, however, remains a matter of some debate [9-14].

In this study, we employed two murine heterotopic heart transplantation procedures, namely, heterotopic heart transplantation [15] and heterotopic heart-lung transplantation [16] for simulating LV complete unloading (CU) and partial unloading (PU) models respectively. By applying several non-invasive (transthoracic echocardiography and ^{18}FDG-PET exams) and invasive (conductance catheter) functional tests in two animal models, we investigated the relative contribution of different LV unloading conditions with regard to the evolution of the grafts‟ morphology, contractile function and glucose metabolism. Histomorphometric evaluation and biochemical tissue analysis were also performed to assess the ventricular

unloading effects on cellular and molecular levels (inflammatory cytokines Il-1α, IL-2, IL-6, IL-10, and TNF-α, angiogenesis cytokine VEGF, and matrix metalloproteinase-2 and -9), as well as to investigate the impact of inflammation, tissue ischemia and collagen degradation on unloading-induced cardiac remodeling.

Methods and materials

Animals and animal models

Adult male Lewis rats (Genest St Isle, France) weighted 300-400g and aged 8-10 weeks were used. All animals received care in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" formulated by the National Society for Medical Research and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1996).

In this study, animal anesthesia was obtained by inhalation of Isoflurane (2 vol%-3 vol%) and Oxygen (2L/min) through nosecone, or via tracheal intubation connected to mechanical ventilation (Minerve, Esternay, France).

Heterotopic heart transplantation (CU group, n = 15) and heterotopic heart-lung transplantation (PU group, n = 10) were performed as previously described [7]. Briefly, for heart procurement, heparin (500U/kg) was injected into donor rats through penien vein, and 10 mL cardioplegic solution Celsior (Genzyme Corp., Boston) was administrated *via* a catheter inserted into the ascending aorta following cross-clamping, heart or heart-lung grafts were thereafter harvested. For transplantation, in CU group (**Figure 1A, 1C**), the donors‟ ascending aorta (Asc Ao) and pulmonary artery (PA) were anastomosed to the recipients‟ abdominal aorta (AAo) and inferior vena cava (IVC) respectively; while the donors‟ superior vena cava (SVC), IVC and pulmonary veins (PV) were ligated. In PU group (**Figure 1B, 1D**), the donors‟ Asc Ao was anastomosed to the recipients‟ AAo, the donors‟ SVC and IVC were ligated, while the pulmonary artery and veins were intact. 8-0 Prolene suture was used for anastomosis.

The surgical success rates in CU group and PU group were 80% (12/15) and 70% (7/10) respectively. The graft lost was due to hemorrhage (2 in CU group and 1 in PU group) and primary graft dysfunction (1 in CU group and 2 in PU group). During follow-up, no secondary graft lost was observed.

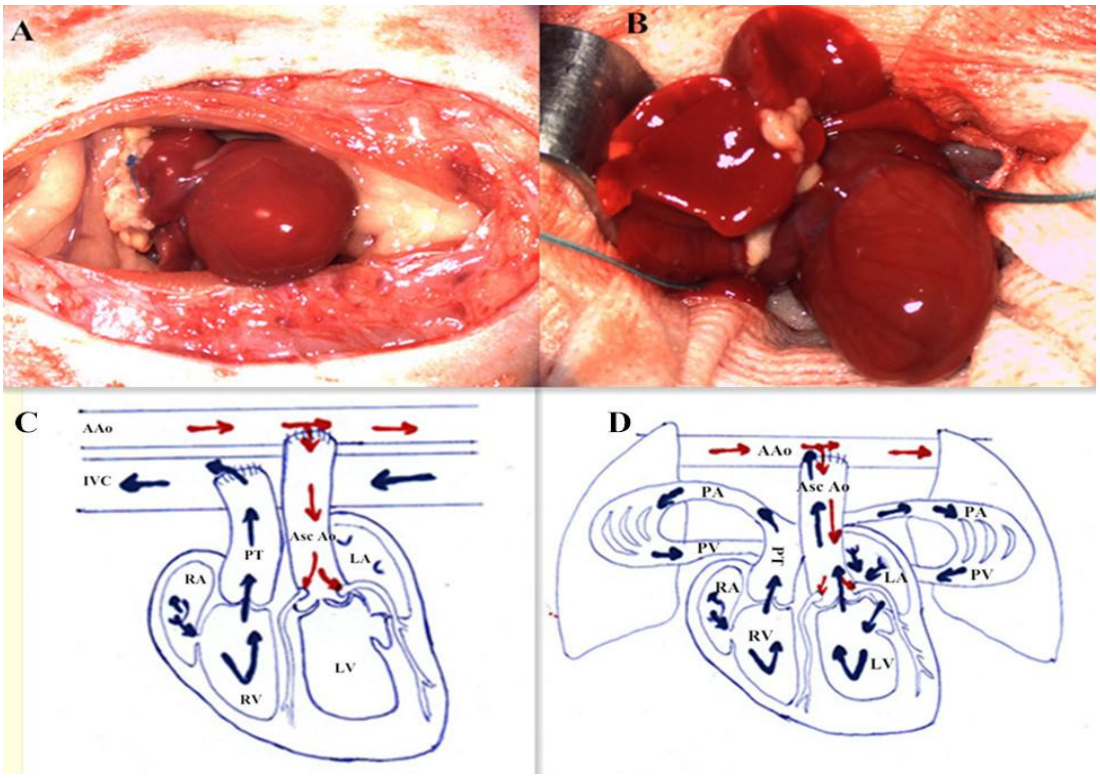


Figure 1. CU heart (A) and PU heart (B) after reperfusion at Day 0; schemas illustrating the anastomoses and the blood flow (red arrows indicate artery blood and blue arrows indicate venous blood) of CU heart (C) and PU heart (D). AAo, abdominal aorta; IVC, inferior vena cava; Asc Ao, ascending aorta; PT, pulmonary trunk; PA, pulmonary artery; PV, pulmonary vein; RA, right atrium; RV, right ventricle; LA, left atrium; LV, left ventricle; CU, complete unloading; PU, partial unloading.

Echocardiography

Echocardiography was performed serially at postoperative day (POD) 0, 14 and 28 on the heterotopic and orthotopic hearts in the recipients. Data acquisition and analysis were obtained with a commercially available echocardiograph system (Philips, Netherland) equipped with a 14-MHz frequency transducer. 2-dimensional, color-doppler and doppler flow models (**Figure 2**) were performed for qualitative measurements. M-mode tracings were recorded with a two-dimensional short axis view at the level of mitral papillary muscle. The recorded parameters included: left ventricular end-systolic dimension (LVDs), left ventricular end-diastolic dimension (LVDd), posterior wall thickness (LPWT), diastolic inter-ventricular septum thickness (IVSD), left ventricular fractional shortening (LVFS) and left ventricular ejection fraction (LVEF).

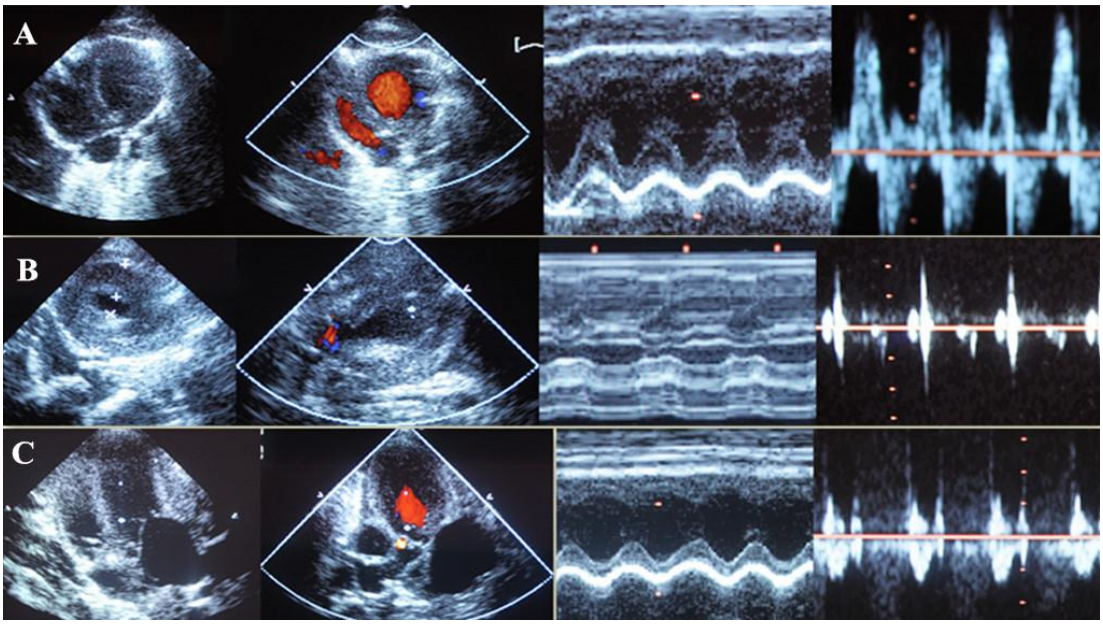


Figure 2. Echocardiography at Day 0 with different modalities for structural and functional evaluation of the orthotopic hearts and heterotopic transplants. From left to right, the modes were 2-dimensional, color-Doppler, M-mode and Doppler flow in the left ventricular outflow tract, respectively. (A) orthotopic heart, (B) CU heart and (C) PU heart.

^{18}FDG-PET

Cardiac glucose metabolism was analyzed by ^{18}FDG-PET at POD7. Animals were prepared as elsewhere described [17], including fasting overnight and premedication with Acipimox. An activity of 70 MBq of FDG was injected intravenously 60 min prior to a three-dimensional PET recording, using a dedicated small animal ECG-triggered PET system (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, USA). Mean myocardial activity of FDG was determined with hand-drawn Region of Interest (ROI) both on the transplants and on the orthotopic hearts.

Left ventricle pressure-volume (P-V) conductance catheter

At POD28, the hemodynamic performance of transplants and orthotopic hearts was evaluated by means of P-V catheter (SPR-838, 2F, Millar Instruments Inc.). Data were recorded and analyzed using the MPVS Ultra and emka Technologies‟ Iox2 acquisition software (Millar Instruments Inc.). The orthotopic hearts were approached via right carotid artery access, while the transplants were approached through a stab wound in heart apex with 28-Gauge needle.

Histomorphometry and cardiac collagen evaluation

Animals were sacrificed after conductance catheter measurement. The orthotopic and heterotopic hearts were harvested, weighted and cut equally into two parts along the great axe of LV. Half of tissue sample was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further biochemical analysis. Another part was fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. The cardiomyocyte size was determined as previously described [18] with H&E-stained sections. Briefly, at 400× magnification, 10 myocytes per section were randomly selected, which met the inclusion criteria (major: minor transverse axes ratio < 1.2). We outlined cardiomyocytes manually and the cross-sectional area was measured with Cellsens v1.6 softward (Olympus). Heart sections (5μm) were stained with Picrosirius red for the assessment of total collagen content by measuring red stained areas over field area with Image J software (http://imagej.nih.gov/), as previously reported [19]

Measurement of tissue inflammatory cytokines and Matrix Metalloproteinases (MMPs)

Cytokines IL-1α, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α and VEGF of LV samples were assessed using a BioPlex cytokine assay kit with the BioPlex manager software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Levels of MMP-2 and MMP-9 were measured using ELISA kits (Elabscience Biotechnology Co, Ltd) according to the manufacture"s instructions.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Comparisons between groups were done with unpaired student"s t-test as appropriate. Correlation of coefficients was calculated with the least-squares linear regression analysis. $P<0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed using the SPSS software package 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

Echocardiography

As illustrated in **Figure 3**, the serial echocardiography revealed progressively decreased LPWT and IVSD over 4 weeks. In contrast, LVDd and LVDs changed little during the follow-up, while the LVFS and LVEF remained stable.

Between CU and PU groups, there was no significant difference in LPWT at every time point but the decrease trended to be more substantial in CU group. PU group had a throughout greater LVDd but a comparable LVDs. The LVFS and LVEF were consistently greater in PU group.

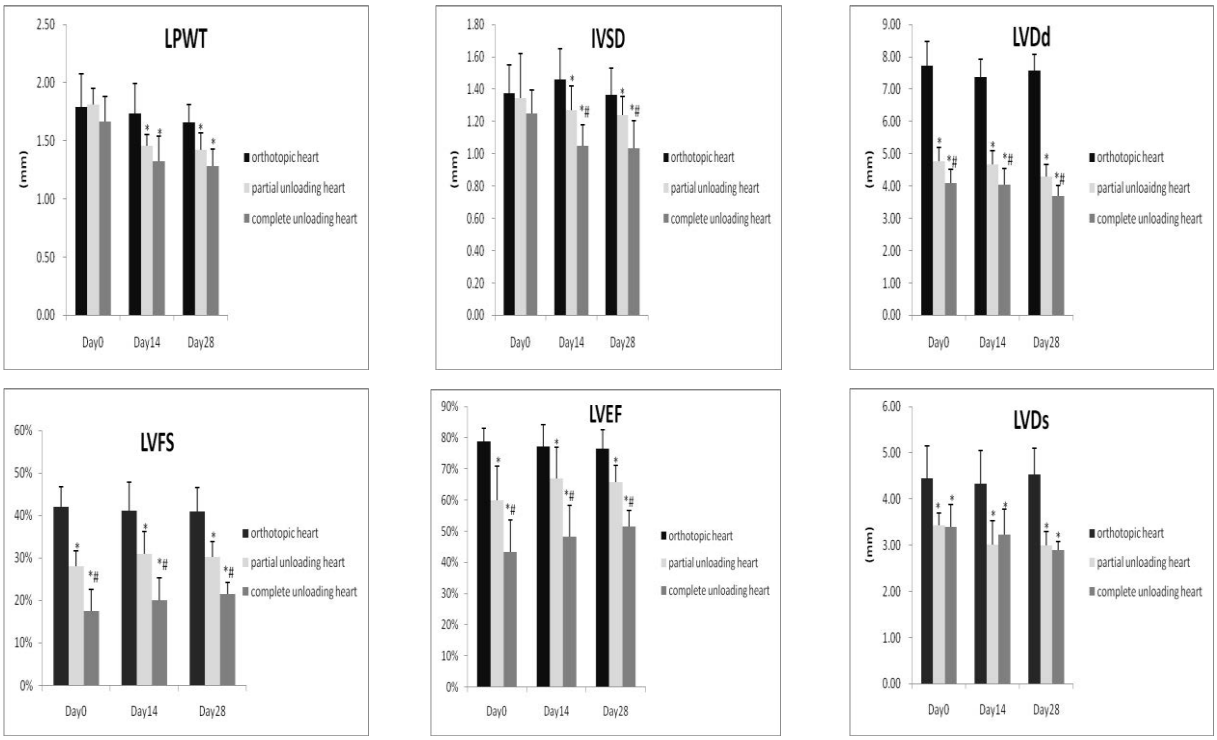


Figure 3. Echocardiographic measurements of orthotopic, PU and CU hearts at Day0, Day14, Day28. * $p<0.05$, compared with orthotopic heart; # $p<0.05$, compared with PU heart. LPWT, left ventricular posterior wall thickness; IVSD, intraventricular septum thickness; LVDd, left ventricular end-diastolic internal dimension; LVDS, left ventricular end-systolic internal dimension; LVFS, left ventricular fractional shortening; LVEF, left ventricular ejection fraction.

^{18}FDG-PET

The PU hearts and CU hearts presented with both a significant decrease of ^{18}FDG uptake in comparison to the orthotopic hearts (**Figure 4**). The mean isotopic signal intensity of the

grafts was standardized to that of the orthotopic hearts. The ratio (grafts/orthotopic hearts) of FDG uptake was significantly higher in PU group than CU group (21.7%±4.5% *vs* 12.0%±3.9%, p=0.047).

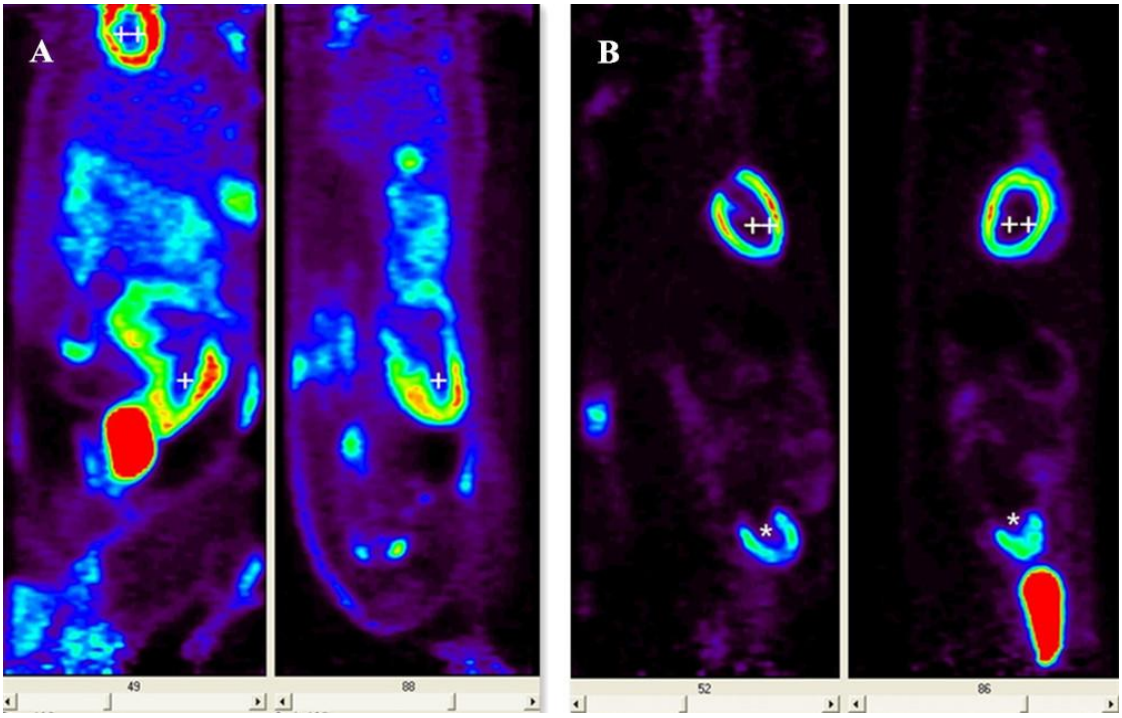


Figure 4. 3-dimension reconstructive images showed 18FDG uptake of the orthotopic hearts and heterotopic transplants. (A) recipient of CU heart; (B) recipient of PU heart.. ++, orthotopic heart; + PU heart; * CU heart.

P-V conductance catheter

Compared to the orthotopic hearts, the PU hearts and CU hearts presented with both lower heart rates, less mechanical work (left ventricular systolic pressure, stroke volume and cardiac output), and compromised contractility (dP/dTmax) and relaxation (-dP/dTmin). Compared to PU hearts, the CU hearts had a significantly lower stroke volume, less cardiac output and less stroke work. The pressure-volume catheter revealed that the contractility was better preserved in PU group than CU group, while the relaxation was similarly deteriorated in both groups (**Table 1**). The ratio (heterotopic grafts/orthotopic hearts) of cardiac mechanical work (stroke work × heart rates) was correlated to the ratio (heterotopic grafts/orthotopic hearts) of myocardial FDG activity (**Figure 5**), and we found a linear relationship between the two parameters with a Pearson's correlation coefficient of 0.84 (p<0.05).

Table1. Pressure-volume conductance catheter at POD 28

parameters	orthotopic hearts (n=19)	Partial unloading hearts (n=7)	Complete unloading hearts (n=12)
Heart rate(/min)	296±32.3	236.2±14.5 *	249.3±25.5 *
ESP (mmHg)	103.3±16.2	87.4±7.78 *	79.9±14.0 *
EDP (mmHg)	6.2±2.5	4.4±1.81	6.08±3.8
SV (μL)	116.6±25.6	61.6±15.8 *	33.0±11.1 *#
SW (mmHg.μL)	8047±2270.4	4312.4±1334.4 *	2105.8±935.4 *#
CO (μL/min)	45312±6892.6	13937±4671.7 *	8749.1±3581.4 *#
dP/dT max (mmHg/s)	5452.2±1615.4	4485.4±1554.8 *	2513.5±951.4 *#
-dP/dT min (mmHg/s)	-5316.9±1604.5	-2697.4±665.6 *	-2238.2±1023.3 *

ESP, end systolic pressure; EDP, end diastolic pressure; SV, stroke volume; SW, stroke work; CO, cardiac output. *p<0.05 compared with orthotopic hearts, #p<0.05 compared with PU heart.

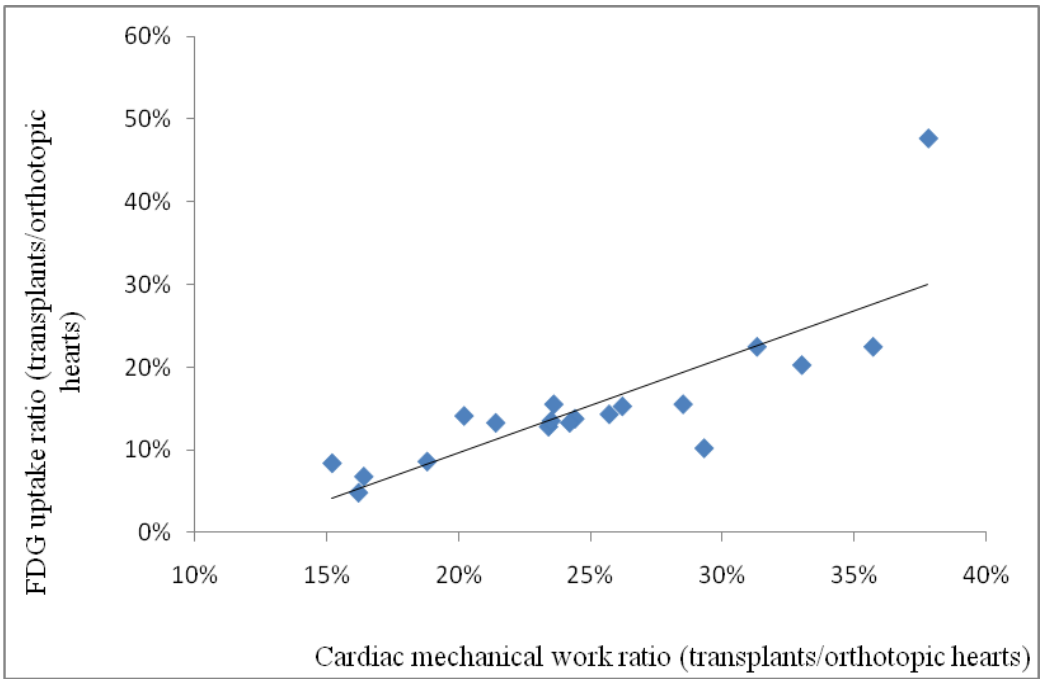


Figure 5. Linear regression relationship between the ratio (heterotopic grafts/orthotopic hearts) of cardiac mechanical work and the ratio (heterotopic grafts/orthotopic hearts) of FDG uptake (r=0.84, p<0.05). Cardiac mechanical work=cardiac output × heart rates.

Histology

As shown in **Figure 6**, at POD 28, the wet weight of the orthotopic hearts, PU hearts and CU hearts was 1067.6±38.4 mg, 623.4±123.6 mg and 483.4±48.4 mg respectively (all $p<0.05$). A similar decreasing order was evidenced in the size of cardiomyocytes expressed by the cross sectional areas, of which, however, the difference was not significant between PU group and CU group (377.4± 132.2 μm^2 *vs* 347.6± 122.9 μm^2, $p=0.14$). The Picrosirius red staining revealed more collagen content in the transplants than the orthotopic hearts in both PU group (3.2±1.0% *vs* 1.0±0.4%, $p=0.02$) and CU group (4.4±1.1% *vs* 1.0± 0.4%, $p<0.01$), while the difference between them was not significant ($p=0.18$).

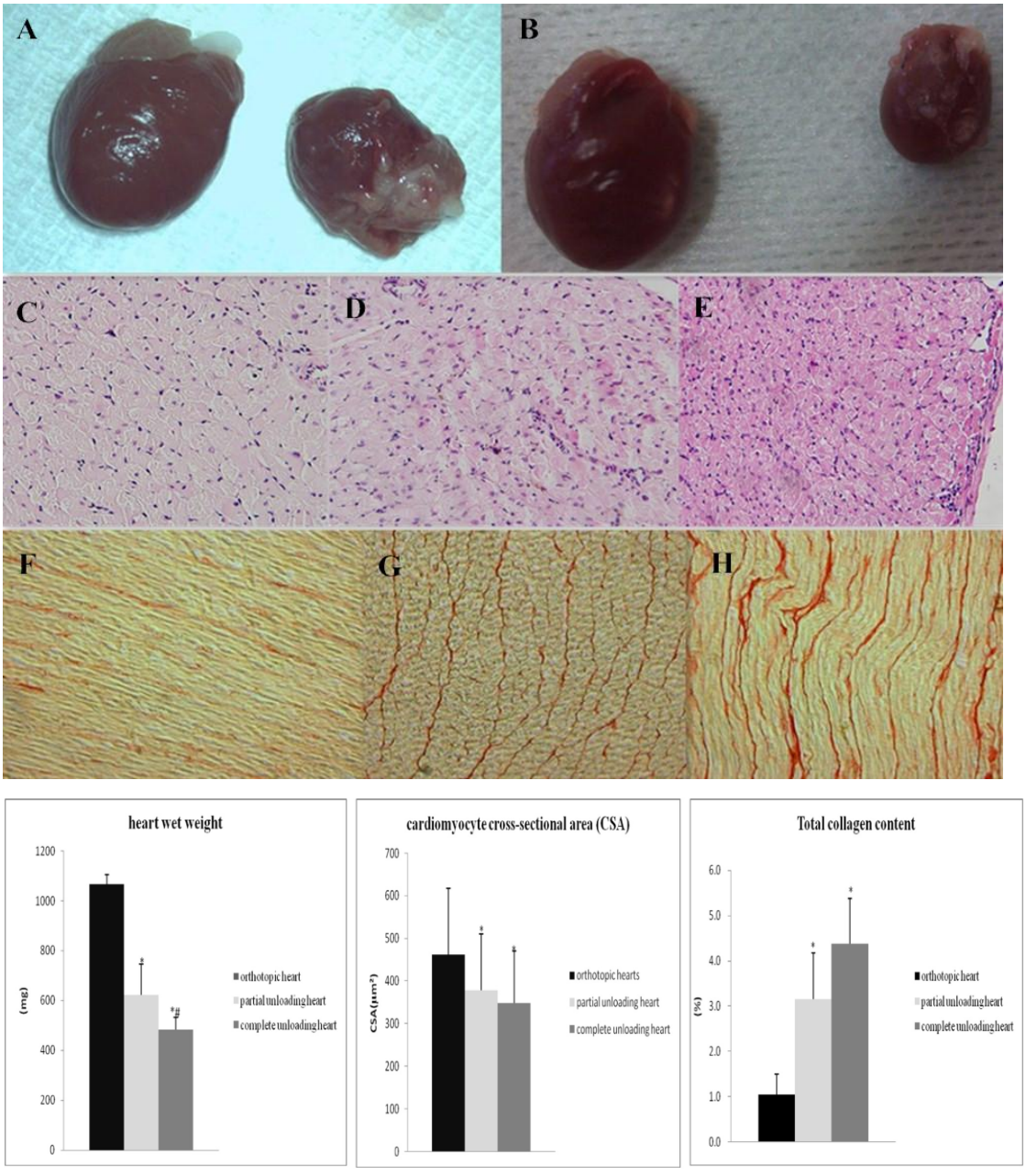


Figure 6. Photos and histograms demonstrated LV unloading-related myocardial atrophy in macroscopic and

microscopic (H&E staining, ×400) views, and cardiac fibrosis (Picrosirius red taining, × 200). (A) atrophic change of PU heart (right side) compared with orthotopic heart (left side); (B) more substantial atrophy in CU heart (right side) compared with orthotopic heart (left side); cardiomyocyte size in the order: orthotopic heart (C)>PU heart (D)>CU heart(E); collagen content in the order: orthotopic heart (F)<PU heart (G)<CU heart (H). *, $p<0.05$ compared to orthotopic hearts; #, $p<0.05$ compared to PU hearts.

Cytokines and MMPs

Table 2 showed the assessment of pro-inflammatory cytokines (IL-1α, TNF-α), anti-inflammatory cytokines (IL-6, IL-10), lymphocyte regulator cytokine (Il-2), angiogenesis cytokine (VEGF) and gelatinases (MMP-2, MMP-9) in three groups. We observed in unloaded hearts, compared to orthotopic hearts, a simultaneous increase of a pro- (TNF-α) and an anti-inflammatory cytokine (IL-10), and decrease of VEGF. Other cytokines and MMPs remained comparable in three groups. No significant difference between PU and CU groups was noted in the levels of aforementioned molecules.

Table 2. Levels of cytokines and MMPs in heart tissues

Cytokines/MMPs	Orthotopic hearts	PU hearts	CU hearts
IL-1α (pg/mg)	34.3±14.5	32.1±15.1	33.5±11.0
IL-2 (pg/mg)	392.6±123.8	374.3±123.9	422.9±76.6
IL-6 (pg/mg)	121.1± 61.9	139.5±71.8	95.4±40.1
IL-10 (pg/mg)	3274.0±1097.8	4031.8±1943.5 *	4256.9±568.6 *
TNF-α (pg/mg)	85.1±23.7	109.2±21.9 *	130.9±32.3 *
VEGF (pg/mg)	54.7±16.5	41.2±21.2 *	35.1±12.4 *
MMP-2 (ng/mg)	21.4±8.2	22.9±9.1	26.5±5.0
MMP-9 (ng/mg)	1.46±0.43	1.62±0.51	1.73±0.68

The results of cytokines were expressed as pg per mg total protein and the MMPs as ng per mg total protein.

* $p<0.05$ compared with orthotopic hearts

Discussion

Consistent with previous studies, we demonstrated that chronic mechanical unloading in normal hearts is associated with myocardial atrophy [9-14], cardiac fibrosis [14, 21], and reduced glucose metabolism [13, 20]. Yet our multimodal approach comparing two unloading conditions also provided with new insights with regard to the impact of unloading intensity on myocardial remodeling.

Animal models of different LV unloading intensity

The "complete LV volume unloading" effect provided by classic Ono's heterotopic heart transplantation procedure has been proven to lead to cardiac atrophy, which could be detrimental to the hemodynamic performance of non-failing grafts [8, 11-13]. In order to create "volume-loaded" HHT models, several modified procedures based on Ono's technique have previously been described, variously aimed at provoking aortic regurgitation by excising one aortic cusp [22], creating an intra-atrial septal defect [12], or performing an additional anastomosis between the left atrium of the graft and the donor's abdominal aorta (AAo) [23]. While these modified techniques have been shown to enable LV volume loading *via* regurgitated arterial blood or shunted venous blood, they also present several obvious disadvantages such as compromising the structural integrity of heart grafts and prolonging operating time. Heterotopic heart-lung transplantation (HHLT) in rats was recently introduced by Mizuno with the aim of establishing an unloading-reloading model to simulate LVADs removal [16]. This also enables the partial loading of the transplant LV by the coronary flow following pulmonary circulation. Compared to the aforementioned volume loading techniques, HHLT is a simple and time-saving procedure.

Chronic mechanical unloading and cardiac atrophy

The regression of cardiac hypertrophy is one of benefits afforded by VADs to promote cardiac recovery, though excessive mechanical unloading leads to heart atrophy, which can present an obstacle for sustained recovery [7]. Unloading-induced cardiac atrophy is a common phenomenon in both clinical and experimental contexts, yet little is known about the precise mechanism governing the atrophic process. Autophagy, apoptosis, and the up-regulation of the

proteolytic signal pathway [24-27] have been suggested as cause of this “disuse atrophy”. In our study, we observed a more substantial macroscopic and microscopic atrophy in PU hearts than CU hearts. The interpretation of this finding in terms of clinical implementation is that adequate but not excessive unloading might be helpful for cardiac recovery by reducing the degree of atrophy. However, the “adequacy” of mechanical unloading remains further defined.

Chronic mechanical unloading and cardiac function

The ventricular P-V relationship that has been obtained by means of conductance catheter represents the most rigorous and comprehensive methodology to date for evaluating intact heart function [28], especially the measurement with reduced preload by IVC occlusion allows obtaining load-independent parameters such as end-systolic elastance (*E*es) and dP/dTmax-end-diastolic volume. Unfortunately, in our study, we could obtain load-independent parameters in the orthotopic hearts but not in the heterotopic transplants in which a prompt reduction of ventricular loading status was impossible. Nevertheless, the LV pressure-volume methodology remained a useful and productive examination for a functional evaluation of the heart grafts. With this method, we observed a better preserved systolic function (dP/dTmax) and more external mechanical work (cardiac output, stroke work) in the partial unloading hearts, compared to the complete unloading hearts. So far, the different LV volume status could explain the differences of hemodynamic performance of heterotopic transplants. Whether or not intrinsic myocardial contractility is affected by different unloading degrees requires proofs from refined studies such as assessment of the contractibility of isolated cardiomyocyte. We observed similar deterioration of diastolic function (-dP/dTmin) in both unloading conditions, which was attributed to increased collagen content responsible for increased stiffness and relaxation problems. Interestingly, CU hearts presented with also a considerable stroke volume (33.0±11.1μL). We postulated that the myocardial atrophy and reduced wall stress of the heart grafts could have promoted some extent of venous return into the LV through the Thebesian vein

Mechanical unloading and extracellular matrix (ECM) remodeling

A failing heart, regardless of the etiology, is characterized by substantial interstitial fibrosis,

including excessive deposition of ECM proteins, increased total collagen content, and altered collagen subtype and cross-linking [29, 30]. These changes induce increased cardiac stiffness and deteriorated contractile and diastolic function. The effects of mechanical unloading on collagen turnover remain a matter of debate [21, 29, 30]. While several clinical and experimental studies have demonstrated an increase in collagen content and collagen cross-linking linked to a subsequent increase in myocardial stiffness after LVAD support [14, 21], other investigators have reported opposing results [29]. In our study, we observed an increase in total collagen content of the transplants in both groups, irrespective of the unloading degree, while tissue MMP-2 and -9 levels and inflammatory cytokines (IL-1α, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, VEGF) were comparable with those of the orthotopic hearts. We hypothesized that the increased collagen content observed in non-failing hearts under mechanical unloading was the result of myocardial atrophy, which exaggerates the proportion of collagen, rather than collagen turnover being promoted by collagen degradation and tissue inflammation.

Mechanical unloading and metabolic remodeling

Our study found that mechanical unloading lead to remarkably diminished glucose uptake and the reduction in glucose uptake was proportional to the degree of unloading. Bassingthwaighte [20] hypothesized that coronary flows, and local consumption of substrates and oxygen were in response to the demand for adenosine triphosphate (ATP) which was diminished in the context of ventricular unloading [31], consisting of reduced external mechanical work and internal ionic activities (e.g. heart rates). Another hypothesis was the “switch” of cardiac metabolic substrates in unloading condition. In unloaded hearts, ventricular wall stress and endothelial shear stress were diminished; nitric oxide release as well as nitric oxide-induced glycolysis was therefore reduced. A previous study has demonstrated that metabolic enzymes and transporters (carnitine palmitoyltransferase I, GLUT4) were downregulated in regions where the cardiac muscle was unloaded [20].

Study limitations

Indeed, this study holds several limitations. Our observation was extracted from different unloaded conditions provided by heterotopic transplantation of rodent normal hearts. Complex

physiopathological events of failed hearts in clinical situation i.e. intrinsic cellular and/or tissue disturbance, chronic inflammation, and alteration of neurohormonal environment variously impact on cardiac reverse remodelling processes. Therefore, the observed unloading-dependant myocardial atrophy must be interpreted with caution for clinical application. Similarly, these unloading models are different from clinical circumstance with LVADs in which overloaded myopathic hearts are unloaded towards normal filling pressures. It has been also suggested that intensity and nature of flow (continuous or pulsatile) of LVADs might differently produce LV unloading effect on cardiac remodelling [33]. The CU model triggers more substantial volume unloading than PU and could partially mimic pulsatile pumps. However, PU model differs from continuous flow devices in the hemodynamic characteristics. In PU model, the heterotopic heart grafts have a reduced pre-load but the post-load remains unchanged, being the same with that of the orthotopic hearts; and the grafts must develop sufficient intra-ventricular pressure to launch effective ejection; while the LVADs decrease both the pre-and post-load, resulting in LV volume- and pressure-unloading, and occasional aortic valve opening.

Conclusion

Our study confirmed that volume unloading leads to cardiac remodeling of non-failing hearts, including atrophy, fibrosis, and reduction of mechanical work and glucose metabolism. Cardiac atrophy is the direct and prominent change following mechanical unloading, which exaggerates the proportion of total collagen that is responsible for diastolic dysfunction. Compared to complete unloading, partial unloading is associated with less profound cardiac atrophy and glucose metabolism, and better preserved contractility, whereas the increase of total collagen content and relaxation impairment of heterotopic grafts are comparable regardless of the degree of unloading.

References

[1]A Gonzalez, S Ravassa, J Beaumont, B Lopez, J Diez. New targets to treat the structural remodeling of myocardium. Journal of the American college of cardiology 2011; 58(18): 1833-43.

[2]D.L Mann, P.M Barger, D Burkhoff. Myocardial recovery and the failing heart: myth, magic, or molecular target? J Am Coll Cardiol 2012; 60: 2465-72.

[3]S Maybaum, G Kamalakannan, S Murthy. Cardiac recovery during mechanical assist device support. Semin Thorac Cardiovasc surg 2008; 20: 234-246.

[4]J.L Hall, D.R Fermin, E.J Birks et al. Clinical, molecular, and genomic changes in response to a left ventricular assist device. Journal of the American college of cardiology 2011; 57(6):641-652.

[5]A.V Ambardekar, P.M Buttrick. Reverse remodeling with left ventricular assist devices: A review of clinical, cellular, and molecular effects. Circ Heart Fail 2011; 4(2): 224-33.

[6]S Klotz, AH.J Danser, D Burkhoff. Impact of left ventricular assist deive support on the cardiac reverse remodeling process. Progress in biophysics and molecular biology 2008; 97: 479-96.

[7]M Pokorny, L Cervenka, I Netuka, J Pirk, M Konarik, J Maly. Ventricular assist devices in heart failure: how to support the heart but prevent atrophy? Physiol. Res. 2014; 63: 147-56.

[8]W Oriyanhan, H Tsuneyoshi, T Nishina, S Matsuoka, T Ikeda, M Komeda. Determination of optimal duration of mechanical unloading for failing hearts to achieve bridge to recovery in a rat heterotopic heart transplantation model. J Heart Lung Transplant 2007; 26(1): 16-23.

[9]H Brinks, H Tevaearai, C Muhlfeld, et al. Contractile function is preserved in unloaded hearts despite atrophic remodeling. J Thorac Cardiovasc Surg 2009; 137: 742-6.

[10]DC Welsh, K Dipla, PH Mcnulty, et al. Preserved contractile function despite atrophyc remodeling in unloaded rat hearts. Am J Physiol Heart Circ 2001; 281: 1131-36.

[11]K Ito, M Nakayama, F Hasan, et al. Contractile reserve and calcium regulation are depressed in myocytes from chronically unloaded hearts. Circulation 2003; 107: 1176-82.

[12]K.R Tang-Quan, J Bartos, T Deuse, et al. Non-volume-loaded heart provides a more relevant heterotopic transplantation model. Transplant Immunology 2010; 20: 65-70.

[13]M Didie, D Biermann, R Buchert, et al. Preservation of left ventricular function and morphology in volume-loaded vs. volume-unloaded heterotopic heart transplantation. Am j physiol heart circ physiol 2013; 305(4): H533-41.

[14]H Muranaka, A Marui, M Tsukashita, et al. Prolonged mechanical unloading preserves myocardial

contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis. J Thorac Cardiovasc Surg 2010; 140: 916-22.

[15]M Ibrahim, M Navaratnarajah, P Kukadia, et al. Heterotopic abdominal heart transplantation in rats for functional studies of ventricular unloading. J Surg Res 2013; 179(1):e31-9.

[16]T Mizuno, R.D Weisel, R.K Li. Reloading the heart: A new animal model of left ventricular assist device removal. J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 130:99-106.

[17] S Poussier, F Maskali, N Tran, et al. ECG-triggered 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010; 37(9):1745-50.

[18]S.A Helms, G Azhar, C Zuo, A.A Theus, A Bartke, J.Y Wei. Smaller cardiac cell size and reduced extra-cellular collagen might be beneficial for hearts of Ames dwarf mice. Int J Biol Sci 2010; 65(5): 475-490.

[19]A.M Hadi, KT.B Mouchaers, I Schalij, et al. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new marco-based automated analysis. Cell Oncol 2011; 34(4): 343-54.

[20]J.B Bassingthwaighte, Z Li. Heterogeneities in myocardial flow and metabolism:exacerbation with abnormal excitation. Am J Cardio 1999; 83(12):7-12.

[21]S Klotz, R.F Foronjy, M.L Dickstein, et al. Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness. Circulation 2005; 112:364-74.

[22]A.U Spencer, J.P Hart, S.E Cabreriza, D.G Rabkin, A.D Weinberg, H.M Spotnitz. Aortic regurgitation in the heterotopic rat heart transplantation: effect on ventricular remodeling and diastolic function. J heart lung transplant 2003; 22(8): 937-45.

[23]P.H Wen, X.L wang, T Li, et al. Establishment of a novel volume-loaded heterotopic heart transplantation model in rats. Journal of surgical research 2013; 183: 435-41.

[24]S Schna, Y Kurimoto, J Fukada, et al. Effects of ventricular unloading on apoptosis and atrophy of cardiac myocytes. journal of surgical research 2001; 120: 119-126.

[25]R.X Xu, F.Q Lin, S.J Zhang, X Chen, S.S Hu, Z Zhang. Signal pathways involved in reverse remodeling of hypertrophic rat heart after pressure unloading. International journal of cardiology 2010; 140: 414-23.

[26]G Soppa, J Lee, M.A Stagg, et al. Role and possible mechanisms of clenbuterol in enhancing reverse remodeling during mechanical unloading in murine heart failure. Cardiovascular research 2008; 77: 695-706.

[27]D.J Cao, N Jiang, A Blagg, et al. Mechanical unloading activate FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. J Am Heart Assoc. 2013; 2:e000016.

[28]P Pacher, T Nagayama, P Mukhopadhyay, S Batkai, D.a Kass. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. Nat Protoc 2008; 3(9): 1422-34.

[29]S Maybaum, D Mancini, S xydas, et al. Cardiac improvement during mechanical circulatory support: A prospective multicenter study of the LVAD working group. Circulation 2007; 115:2497-505.

[30]S.G Drakos, J.V Terrovitis, M.I Anastasiou-Nana, J.N Nanas. Reverse remodeling during long-term mechanical unloading of the left ventricle. Journal of molecular and cellular cardiology 2007; 43: 231-42.

[31]H Suga. Global cardiac function: mechano-energetico-informatics. Journal of biomechanics 2003; 36: 713-20.

[32]M. Bilsen, F.A Nieuwenhoven, G.J Der Vusse. Metabolic remodeling of the failing heart: beneficial or detrimental? Cardiovascular research 2009; 81:420-28.

[33]Kato TS, Chokshi A, Singh P, et al. Effects of continuous- versus pulsatile-flow left ventricular assist devices on myocardial unloading and remodelling. Circ Heart Fail 2011; 4(5): 546-53.

4. Discussion

4.1 Etude n°1: Etude de la perfusion myocardique chez le rat atteint de l'infarctus chronique traitée par l'injection des cellules souches mésenchymateuses en intramyocardique

Dans cette étude, nous avons caractérisé les effets précoces et les effets à long terme de l'administration en intramyocardique de CSMs dans le traitement de l'IDM chronique. Précisément, l'augmentation précoce de la perfusion myocardique (2 jours après l'implantation des cellules) est attribuée à une réaction inflammatoire non spécifique liée au processus d'injection; tandis que l'amélioration soutenue de la perfusion myocardique dans la zone infarcie adjacente du site d'injection résulte d'une néovascularisation favorisée par les CSMs injectées.

Jusqu'à présent, les CSMs utilisées dans la plupart des études cliniques sont d'origine médullaire. Mais quelques problèmes innés limitent l'application extensive de CSMs dans la thérapie cellulaire cardiaque. (1) La moelle osseuse est facile à prélever. Mais la quantité totale des CSMs dans la moelle osseuse, estimée de 0,001% à 0,01% des cellules mononucléaires[4], est largement insuffisante pour avoir un effet thérapeutique efficace. L'aspiration de la moelle osseuse, l'isolation et la sélection des cellules de phénotype spécifique, et l'expansion *in vitro* des cellules ciblées sont nécessaires pour obtenir une quantité suffisante de CSMs. (2) Le protocole de la thérapie avec CSMs est très hétérogène[108], par exemple, le délai optimal et la meilleure voie d'administration restent indéterminés[4]. Dans la phase aiguë, le microenvironnement dans la zone infarcie est supposé être favorable à la réparation du myocarde en présence de cytokines, des facteurs de croissance et des chimiokines qui peuvent améliorer la intégration des cellules; mais en même temps, la réaction inflammatoire et les agents de défense peuvent produire des effets inverses[7,162,163]. En ce qui concerne les études cliniques, les techniques de préparation des cellules sont variables, ainsi que la durée d'incubation et d'expansion[164,165]. Dans la littérature, le nombre de cellules administrées, la voie d'administration, la fonction de base du VG et la durée d'observation sont hétérogènes [6,12]. De plus, les études cliniques ont été réalisées chez les patients avec cardiopathies ischémiques diverses allant de l'IDM aiguë à l'insuffisance cardiaque chronique. Tous ces éléments hétérogènes rendent difficile l'interprétation des résultats obtenus des études cliniques

concernant les effets thérapeutiques des CSMs. (3) Les mécanismes précis des effets thérapeutiques des CSMs, que ce soit via la signalisation paracrine, la fusion cellulaire, l'interaction cellulo-cellualire ou la différentiation en cardiomyocytes, sont largement controversés[136,166–168], non résolus et probablement multifactoriels (**Figure 13**). Actuellement, de plus en plus d'études rapportent l'effet paracrine comme le mécanisme principal[12,169]. La libération des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance par les CSMs est supposée pouvoir inhiber l'apoptose et la fibrose, améliorer la contractilité et activer la régénération endogène à l'aide des cellules souches cardiaques ou circulantes[170]. (4) La rétention et la intégration des CSMs administrées dans le cœur restent faibles. Il est rapporté que moins de 10% des CSMs restaient sur place dans la zone ciblée sur les premières 24 heures et qu'il en restait moins de 1% à 4 semaines[163].

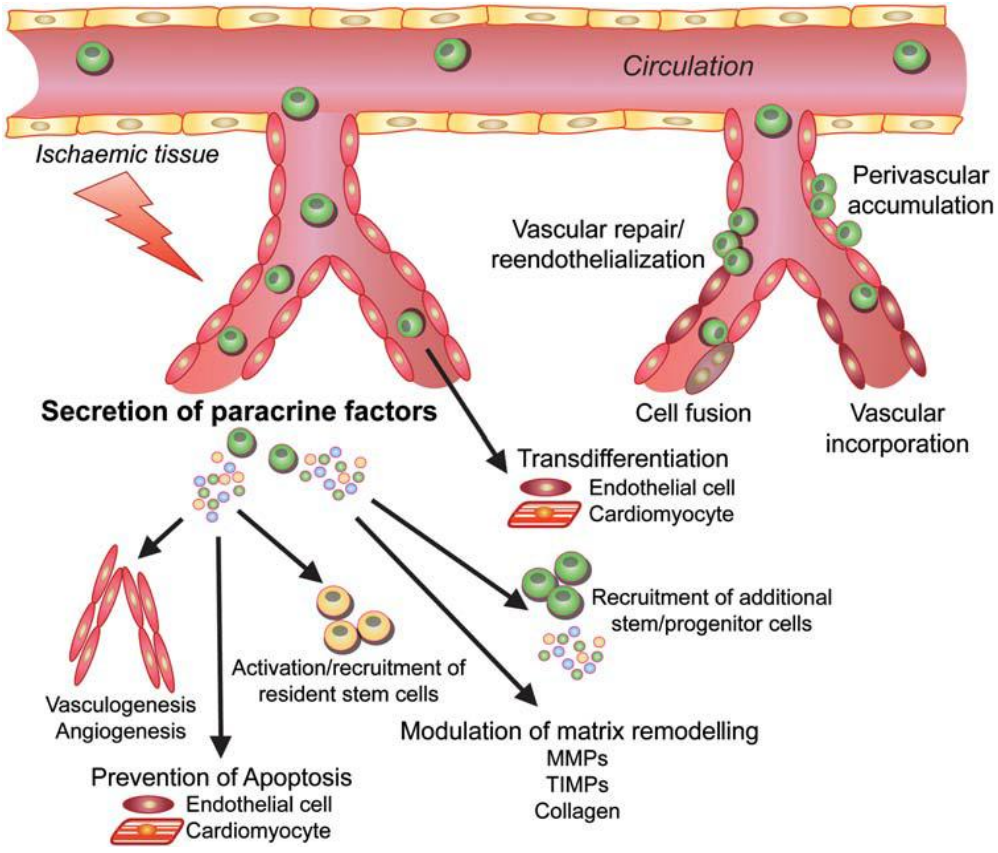


Figure 13: Les mécanismes possibles sous-jacents de la thérapie cellulaire cardiaque.
(D'après J Tongers[107] *et al. European heart journal 2011*)

L'objectif ultime de la thérapie cellulaire de l'IDM chronique est de régénérer des cardiomyocytes pour compenser la perte du tissu myocardique. Malheureusement, de

nombreuses études ont montré que la régénération du myocarde, à partir des cellules progénitrices, était difficile et pratiquement irréalisable dans les conditions normales[168,171]. Le but de la revascularisation, par angioplastie ou par chirurgie, est de convertir les cardiomyocytes „hibernants“ et „sidérés“ en cardiomyocytes fonctionnels dont la caractéristique primaire est de restaurer un métabolisme approprié. La revascularisation interventionnelle ou chirurgicale présente un inconvénient. En effet, le réseau vasculaire est détruit dans la zone infarcie où les cardiomyocytes hibernants/sidérés bénéficient très peu de la revascularisation. C“est pourquoi l“angiogénèse/néovascularisation dans la zone infarcie (**Figure 14**) devient la cible d“approches thérapeutiques innovantes. Les études antérieures ont montré que l“administration intramyocardique des cellules souches pouvait améliorer la perfusion sanguine dans le zone infarcie, les mécanismes précis restent très peu connus.

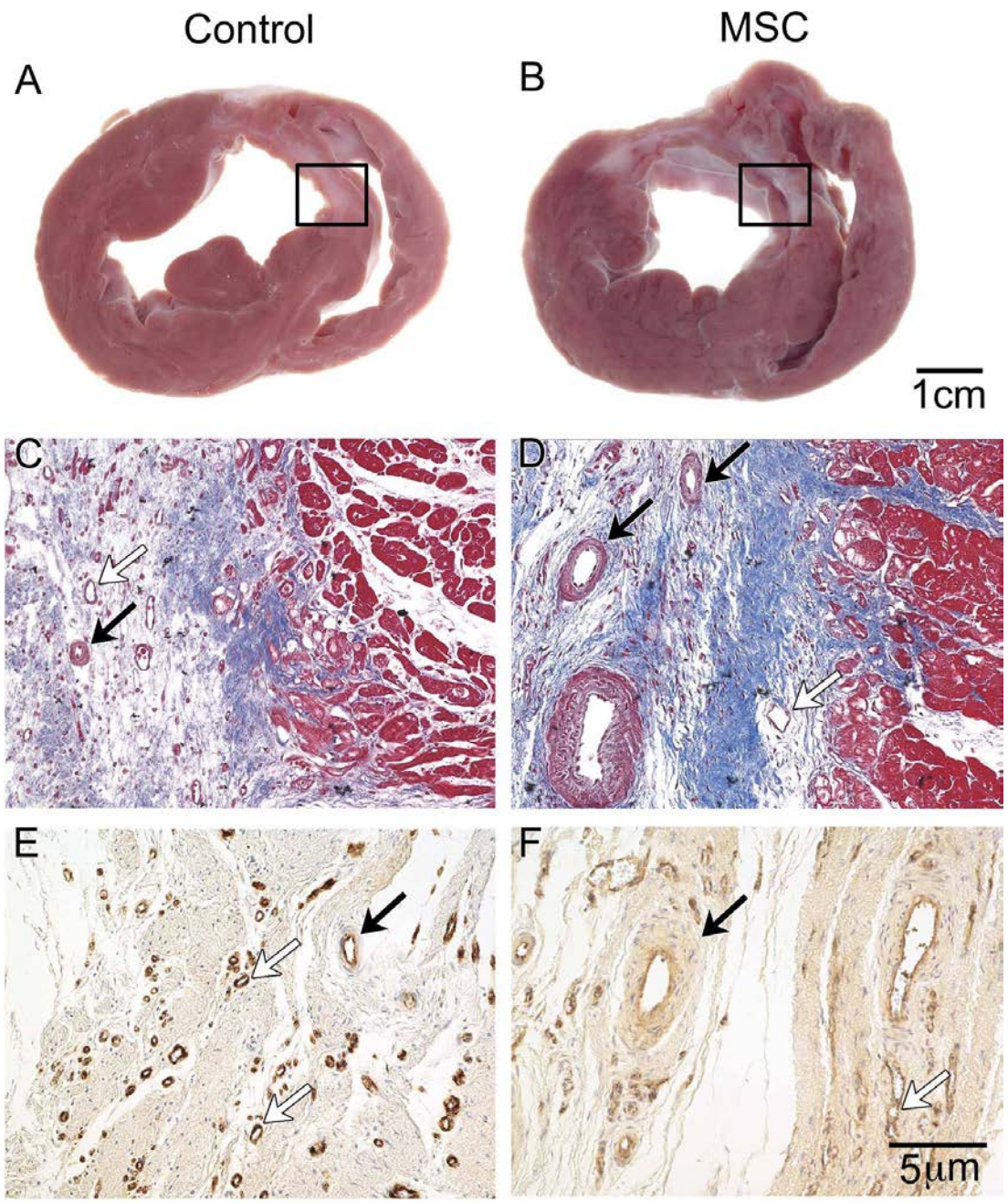


Figure 14: L'impact de la thérapie avec des CSMs sur l'angiogénèse.

Il n'y a pas de différence significative du nombre de néo-vaisseaux entre le groupe contrôle et le groupe traité. Cependant, le nombre des néo-vaisseaux de grande taille ou de taille moyenne est plus élevé dans le groupe traité par des CSMs que dans le groupe contrôle. C et D, coloration trichrome de Masson ; E et F, coloration immunohistochimi avec le facteur Von Willebrand. Les flèches blanches signifient de petits néo-vaisseaux et les flèches noires signifient les néo-vaisseaux de grande taille et de taille moyenne. (D'après KH. Schuleri[167] *et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008.*)

Le taux d'intégration et de différenciation de CSMs dans le cœur restent faibles par rapport à

la récupération fonctionnelle significative après administration cellulaire. La question se pose si l'intégration et la différenciation sont des mécanismes prédominants de la thérapie cellulaire. Les CSMs sont connues pour sécréter les facteurs solubles paracrines qui contribuent probablement à la cardiomyogénèse et l'angiogénèse endogène[172,173]. Les CSMs sécrètent plusieurs cytokines et facteurs de croissance qui suppriment le système immun, la fibrose et l'apoptose tout en favorisant l'angiogénèse[174].

Les études *in vitro* ont montré que la culture des CSMs en hypoxie inhibait l'apoptose et déclenchait la contraction spontanée des cardiomyocytes du rat[175]. Quand ce milieu de culture était injecté dans les cœurs post-infarcis des rats, une diminution de la taille d'infarctus et une amélioration de la fonction cardiaque ont été constatées[172]. L'expression des gènes codant pour les *VEGF, FGF-2, HGF, IGF-I* était régularisée à la hausse chez les CSMs cultivées en hypoxie[175]. De plus, cette étude a également montré que l'amélioration fonctionnelle était observée dans les premières 72 heures, durée trop courte pour que les cellules s'intègrent, se différencient et provoquent un effet sur la fonction cardiaque. Par contre, les intermédiaires solubles comme cytokines et facteurs de croissance peuvent agir rapidement. C'est une preuve indirecte en faveur des effets paracrines importants dans la thérapie cellulaire cardiaque.

Des facteurs de croissance et des cytokines tels que *VEGF, bFGF, monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)* améliorent la prolifération des endothéliums et des myocytes lisses[173]. La concentration locale de la *VEGF* et la *FGF* est plus élevée dans le groupe traité que dans le groupe contrôle chez un modèle murin d'ischémie périphérique. Les CSMs étaient détectées entre J7 et J28 post-transplantation mais une néovascularisation n'a pas été observée dans ce groupe.

Dans notre étude, nous avons observé, en utilisant le ^{99}Tc-SPECT, une amélioration de la perfusion dès le 2^{e} jour après injection des CSMs dans la zone infarcie chez des rats porteurs d'un IDM de 4 mois. Cependant, une amélioration similaire a été observée chez des rats contrôles qui avaient subi une injection du sérum physiologique. Cela suggère que l'amélioration précoce de la perfusion myocardique était probablement associée à une réaction inflammatoire post-injection au lieu d'être liée aux effets bénéfiques des CSMs injectées. En fait, l'injection intramyocardique avec une aiguille de 25 Gauge était forcément responsable d'un endommagement tissulaire et d'une inflammation secondaire au traumatisme mécanique.

Ce phénomène était comparable à la revascularisation myocardique par laser en créant des canaux.

Grâce à la technique de marquage *in vivo* des CSMs transplantées, notre étude a également montré un renforcement soutenu de la perfusion dans la zone infarcie dans le groupe traité avec des CSMs. L'analyse par segment révélait une perfusion améliorée principalement dans la zone adjacente du site d'injection où la perfusion résiduelle était déjà élevée avant l'administration cellulaire. Les examens histologiques confirmaient que la densité des capillaires était plus élevée dans la zone bordante que dans le centre de l'infarctus. Bien que la contribution relative des CSMs injectées aux processus d'angiogénèse a été généralement acceptée, le mécanisme sous-jacent n'est pas précis. Plusieurs hypothèses ont été posées : celle des CSMs sécrètent des facteurs angiogéniques, des facteurs de croissance et des chimiokines en faveur de l'angiogénèse ou celle, les CSMs jouant un rôle indirect dans la réparation cardiaque par activation des cellules souches cardiaques/circulantes.

Bien que le SPECT a montré une amélioration soutenue de la perfusion dans la zone infarcie, notamment dans la région bordante du site d'injection initiale, le même examen d'imagerie n'a pas trouvé de différence significative au niveau fonctionnel ou structural cardiaque entre pré- et post-injection, ni entre le groupe traité et le groupe témoin. Ce résultat suggère que l'amélioration de la perfusion myocardique n'est pas forcément liée à une récupération fonctionnelle (processus au-dessus du métabolisme et de la viabilité cellulaire). De plus, le suivi par SPECT a révélé que la perfusion dans la zone infarcie s'abaissait vers le niveau basal avec le temps. Nous attribuons ce phénomène à la perte progressive des CSMs injectées. Nous avons précédemment montré qu'une quantité considérable des CSMs restent détectables une semaine après l'injection dans le tissu interstitiel dans la zone infarcie mais elles subissent, elles aussi, l'apoptose en raison de la pénurie notionnelle et de l'environnement défavorable. La population cellulaire est donc diminuée avec le temps, ce qui explique peut-être la décroissance de l'effet bénéfique au niveau de la perfusion myocardique.

Néanmoins, notre étude montre, comme plusieurs études précédentes, que la thérapie cellulaire avec des CSMs dans la réparation cardiaque est sans danger. Nous n'avons pas observé de complications graves telles que l'arythmie ventriculaire, la tumérogénèse ou la calcification tissulaire qui seraient dues à l'injection des CSMs.

4.2 Etude n°2: La culture cellulaire en hypoxie à long terme améliore les effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses murines autologues de la moëlle osseuse pour traiter l'infarctus chronique du myocarde

Comme démontré dans l'étude n°1, le microenvironnement hostile dans la zone infarcie constitue un obstacle pour l'intégration et la survie des CSMs injectées et joue un rôle négatif sur leurs effets thérapeutiques. L'hypothèse a été posée que le préconditionnement de CSMs à l'hypoxie peut améliorer leurs caractéristiques biologiques et favoriser leurs effets thérapeutiques, puisque l'origine et la destination de CSMs dans la réparation cardiaque est toujours un milieu hypoxique.

Depuis 1963, quand la technique de l'isolement et la culture *in vitro* des CSMs ont été rapportées, la plupart des recherches se sont focalisées sur l'identification des CSMs et des marqueurs moléculaires qui ont permis d'isoler et d'identifier les cellules souches de différents types et de définir leur différenciation. Par ailleurs, le développement des méthodes spécifiques d'isolement et d'identification de cellules souches est nécessaire pour étudier les mécanismes sous-jacents de la multipotence et la capacité auto-renouvelable. Malheureusement, la concentration en oxygène du milieu de culture (facteur environnemental jouant un rôle crucial au destin et à la fonction des cellules souches) n'a pas été étudiée comme il devrait. Récemment, les chercheurs ont commencé à faire varier la concentration en oxygène dans la culture de cellules souches en créant un environnement hypoxique ressemblant à la condition *in vivo*. Des revues paraissent au sujet de l'effet de la culture en hypoxie sur les caractéristiques des CSMs telles que la prolifération, le potentiel de différentiation, etc.

La capacité d'auto-renouvellement est une caractéristique principale des cellules souches. Une prolifération accélérée est nécessaire pour la thérapie régénérative efficace. Fehrer[176] *et al* a montré que les CSMs-MO cultivées en hypoxie (la concentration en oxygène à 3%) présentaient une durée de vie prolongée (10 cycles cellulaires de plus) par rapport aux CSMs cultivées en normoxie (21% oxygène). De plus, la prolifération accélérée signifie un rendement plus efficace de la culture *in vitro*. Par exemple, on peut obtenir 1×10^9 CSMs en 5 passages cellulaires si elles sont cultivées en hypoxie, mais dans la même durée, seulement 2×10^7 CSMs sont obtenues en normoxie.[177] L'hypoxie sert à maintenir une proportion importante des

cellules d'auto-renouvellement rapide dans les passages tardifs. Cependant la prolifération de CSMs est significativement réduite à la condition que la concentration en oxygène soit inférieure à 1%[178].

Mis à part la croissance rapide, le maintien de la plasticité est aussi un élément important pour l'application des CSMs dans la thérapie régénérative. La différenciation trilignée ostéogénique, chondrogénique et adipogénique est une propriété unique à CSMs[179]. Plusieurs études ont été réalisées pour explorer l'effet de l'oxygène des concentrations différentes sur la différenciation trilignée des CSMs. Raheja[180] *et al* ont rapporté que la différentiation des CSMs en ostéocytes est plus rapide dans l'oxygène à 21% et que le potentiel de différenciation en ostéocytes est très réduit dans l'oxygène à 5%. Par ailleurs la différenciation en ostéocytes n'est pas significativement différente quand la concentration en oxygène est entre 5% et 21%. Basciano[164] *et al* ont trouvé que le potentiel de différenciation en ostéocytes et adipocytes était amélioré chez les CSMs des premiers passages (P2) cultivées en hypoxie (5%). Malgré des controverses, il est généralement accepté que l'hypoxie sert à maintenir un état indifférencié tout en gardant le potentiel de différenciation des CSMs.

En hypoxie, l'HIF-1α inhibe le cycle d'acide tricarboxylique et réduit la production des dérivés réactifs de l'oxygène, conduisant au ralentissement du raccourcissement du télomère[181]. Par conséquent, la sénescence cellulaire est retardée. De plus, l'hypoxie régularise à la hausse l'expression des gènes cibles du Notch (e.g., *Hes et Hey* gènes) qui sont responsables de la prolifération cellulaire[182]. La maintenance de la stabilité génétique est un autre défi pendant l'expansion *in vitro* des CSMs[177]. La production des dérivés réactifs de l'oxygène liée à la respiration mitochondriale est favorisée par le milieu normoxique, tandis que les dérivés réactifs de l'oxygène sont responsables de la formation d'aneuploïdie, le raccourcissement accéléré du télomère, le défaut du checkpoint de l'assemblage des fuseaux et l'ampliation de centrosome, etc[181]. En revanche, en hypoxie, les CSMs mènent un métabolisme anaérobie qui permet de réduire les dérivés réactifs de l'oxygène et augmente éventuellement la biosécurité de la thérapie cellulaire.

La culture des CSMs en hypoxie facilite également la intégration cellulaire via l'accélération de la prolifération des CSMs tout en gardant une proportion des cellules d'auto-renouvellement rapide dans la population[183]. De plus, l'hypoxie favorise l'expression des récepteurs de

chimiokines contribuant à la intégration des CSMs dans les tissus pathologiques par l'intermédiaire de l'interaction des chimiokines et leurs récepteurs[184].

Le constat principal de cette étude, combinant évaluations multimodales *in vitro* et *in vivo,* est que la culture de CSMs en hypoxie pendant 1 mois (1) renforce significativement le potentiel clonogénique et la prolifération cellulaire sans induire des modifications sur la multipotence et (2) améliore la viabilité et la contractilité myocardique après l'injection. Cela est probablement dû à la modulation de la réaction immuno-inflammatoire et la favorisation de l'angiogénèse.

En concordance avec des publications précédentes[8,9,185,186], notre étude montre que la culture de CSMs en hypoxie, comparée à la culture en normoxie, accélère grandement la prolifération cellulaire *in vitro* avec la formation en plus grand nombre d'unités de colonies de fibroblastes et un temps de doublement de la population diminué. Les phénotypes cellulaires et les marqueurs de surface restent stables à chaque passage et sont comparables dans les deux conditions de culture, signifiant que le caractère souche (l'auto-renouvellement et la multipotence) est bien conservé. Nous pensons que la culture de CSMs en hypoxie permanente représente une approche plus adaptée que la culture en hypoxie transitoire pour l'expansion et la sélection cellulaire *in vitro*. Une raison en faveur de la culture en hypoxie est que la niche de cellules souches est hypoxique ; l'expansion *in vitro* en hypoxie physiologique aide à réduire le stress oxydatif et la production des dérivés réactifs de l'oxygène par inhibition de la respiration mitochondriale. De plus, le microenvironnement hostile dans la zone infarcie, comprenant inflammation soutenue, stress oxydatif et pénurie de l'oxygène et de la nutrition, représente un obstacle pour la survie et l'intégration des CSMs injectées. La culture *in vitro* en hypoxie peut renforcer leur métabolisme anaérobie et leur capacité d'adaptation à l'environnement difficile, cette stratégie pouvant éventuellement améliorer la survie des CSMs après l'implantation et ultérieurement renforcer leurs effets thérapeutiques.

Notre étude montre également que la culture des CSMs en hypoxie modifie l'expression des cytokines engagées dans les processus de l'inflammation et de la fibrose. Comme révélé par l'examen du Bio-Plex, les CSMs cultivées en hypoxie, comparées à celles cultivées en normoxie, libèrent moins de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, GM-CSF), plus de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et moins de cytokines pro-fibrosantes (TGF-β1). De plus, notre étude confirme que la culture en hypoxie favorise la production de VEGF, une cytokine

puissante dans le processus d'angiogénèse. Cependant, le réseau des cytokines et la cascade inflammatoire impliqués dans la réparation cardiaque post-infarctus sont élaborés temporellement et spatialement d'une manière complexe. La réponse inflammatoire et la sécrétion des cytokines dynamiques suite à l'IDM jouent un rôle important dans les processus de cicatrisation ainsi que dans les processus de remodelage ventriculaire. Des études précédentes ont révélé que l'immuno-modulation et la voie anti-inflammatoire peuvent être engagées dans la thérapie cellulaire cardiaque[6,166,187]. Dans notre étude, les données *in vivo* démontrent des motifs plus compliqués que la configuration *in vitro* concernant l'expression des cytokines. Dans le groupe hypoxie, la balance GM-CSF/IL-6 semble rééquilibrée en faveur d'un effet net anti-inflammatoire ; d'autre part, le VEGF et le TGF-β1 sont régularisés à la hausse. Les preuves récentes ont montré le rôle essentiel du VEGF et du TGF-β1 dans la cicatrisation tissulaire par la voie de signalisation PI3K/Akt et TGF-β/SMAD2[188].

Le constat principal dans notre étude est que le préconditionnement en hypoxie à long terme des CSMs conduit à un effet bénéfique sur la viabilité tissulaire dans l'infarctus et sur la contractilité intrinsèque. Les études précédentes dans notre laboratoire ont montré que (1) l'amélioration de la viabilité myocardique est l'effet principal de la thérapie cellulaire cardiaque et (2) le mécanisme angiogénique est essentiel dans la médiation de réparation post-infarctus. Dans notre étude, de meilleurs résultats au niveau de la perfusion myocardique segmentaire ont été observés dans le groupe des rats traités par CSMs cultivées en hypoxie. L'examen immunohistochimi révélait une néovascularisation plus importante dans le groupe hypoxie que dans les autres groupes (normixie/contrôle). Le test au Bio-Plex *in vitro* comme *in vivo* a montré que la production de VEGF est favorisée par les CSMs cultivées en hypoxie. L'ensemble de ces constats soulignent que l'angiogénèse par la médiation du VEGF est un des mécanismes principaux sous-jacents de la thérapie cellulaire cardiaque. Comme l'hypoxie est un stimulant important qui favorise la sécrétion du VEGF, la culture des CSMs en hypoxie représente une approche plus efficace que la culture en normoxie dans la réparation cardiaque.

D'après l'examen du cathétérisme Millar, bien qu'il existe une tendance d'amélioration de la fonction cardiaque dans le groupe hypoxie ou normoxie par rapport au groupe contrôle, il n'y a pas de différence statistiquement significative parmi les trois groupes sur les paramètres FE, dP/dT_{max}, dP/dT_{min}, SW et E_{max}. Par contre, le cathéter Millar montrait une amélioration

significative de la contractilité intrinsèque révélée par les paramètres volume-indépendants (PRSW, dP/dT_{max}.EDV) dans le groupe hypoxie par rapport aux deux autres groupes. D'après notre expérience du traitement de l'IDM chronique, il est très difficile d'inverser la déficience fonctionnelle, l'amélioration de la perfusion et de la viabilité n'aboutit pas forcément à une amélioration fonctionnelle globale.

Notre étude présente également des limites. Nous n'avons pas réalisé le marquage cellulaire pour obtenir des informations directes concernant la survie des CSMs et leurs rôles dans le processus de réparation. Nous avons développé une technique de marquage isotopique permettant de suivre *in vivo* les CSMs injectées pendant une durée limité (7 jours)[189]. La technique de surveillance cellulaire à long terme reste à développer.

Pour conclure, notre étude soutient l'hypothèse que la gestion des conditions de l'environnement dans la thérapie cellulaire cardiaque, notamment la culture de CSMs *in vitro* dans un milieu hypoxique ressemblant à l'environnement dans l'infarctus , peut favoriser l'activité coopérative des cytokines et renforcer les effets cardioprotecteurs/réparateurs. L'impact bénéfique des CSMs sur la perfusion et la contractilité myocardique est attribué à la modulation immuno-inflammatoire et la favorisation de l'angiogénèse.

4.3 Etude n°3. L'impact de la décharge ventriculaire chronique sur le remodelage myocardique : l'évaluation multimodale de deux techniques de transplantation hétérotopique chez le rat

En concordance avec des travaux précédents, notre étude montre qu'un cœur normal subit une atrophie myocardique, une fibrose cardiaque et un métabolisme du glucose réduit sous décharge mécanique chronique. De plus, notre approche multimodale offre un nouvel aperçu concernant l'impact de décharge mécanique d'intensités différentes sur le remodelage cardiaque.

Comme nous l'avons dit précédemment, la thérapie régénératrice du myocarde avec les CSMs vise la zone infarcie où les cardiomyocytes sont nécrosés ou ont peu de viabilité. Malgré des stratégies de préconditionnement, la transdifférenciation des CSMs en cellules myocardiques ou vasculaires s'est avérée peu probable. L'amélioration de l'architecture et/ou la perfusion dans le tissu infarci par l'intermédiaire de l'effet paracrine sont considérées comme mécanismes principaux expliquant l'effet thérapeutique des CSMs. En fait, la thérapie cellulaire est une approche locale qui possède une efficacité modérée pour réparer le tissu lésé. En revanche, cette approche montre peu d'effet protecteur sur les cardiomyocytes à distance qui subissent également une surcharge compensative de pression et/ou de volume. La décompensation des cardiomyocytes dans la zone éloignée de l'infarctus déclenche l'évolution vers l'IC, c'est la raison pour laquelle une approche systémique ayant pour objectif de protéger, ou encore décharger les cardiomyocytes à distance, est nécessaire.

Le terme remodelage inverse a été initialement introduit par Levin[190] pour décrire la normalisation de la relation pression-volume observée chez les cœurs explantés ayant été assistés par les DAVs lors de la transplantation. Ce terme est depuis utilisé pour décrire les améliorations structurales et fonctionnelles, cellulaires et infra-cellulaires d'un cœur défaillant sous DAVs ou sous traitement médical. Le remodelage inverse a été observé dans plusieurs contextes cliniques, y compris la myocardite virale, cardiomyopathie post-partum, etc. Un grand nombre d'études cliniques ont montré que le remodelage inverse est associé à une amélioration du pronostic de l'IC. Même si le mécanisme précis de la normalisation de la

morphologie et la fonction cardiaque lors du remodelage inverse n'est pas encore au point, certains phénomènes biologiques cellulaires sont presque constamment observés, tels que la régression de l'hypertrophie des cellules myocardiques avec la normalisation d'expression de gènes modulant la sarcomèrogénèse, la voie de signalisation β-adrénergique et les protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction.

La régression de l'hypertrophie cardiaque est un effet bénéfique des DAVs dans le processus de réparation cardiaque. Cependant, la décharge mécanique excessive peut induire l'atrophie cardiaque qui représente un obstacle pour la récupération cardiaque soutenue[191]. L'atrophie cardiaque induite par la décharge mécanique est un phénomène courant dans le contexte clinique (**Figure 15**) et expérimental. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairs. L'autophagie, l'apoptose et la régulation à la hausse des voies de signalisation protéolytique ont été mis en hypothèse pour expliquer l'atrophie de non-utilisation[192–194].

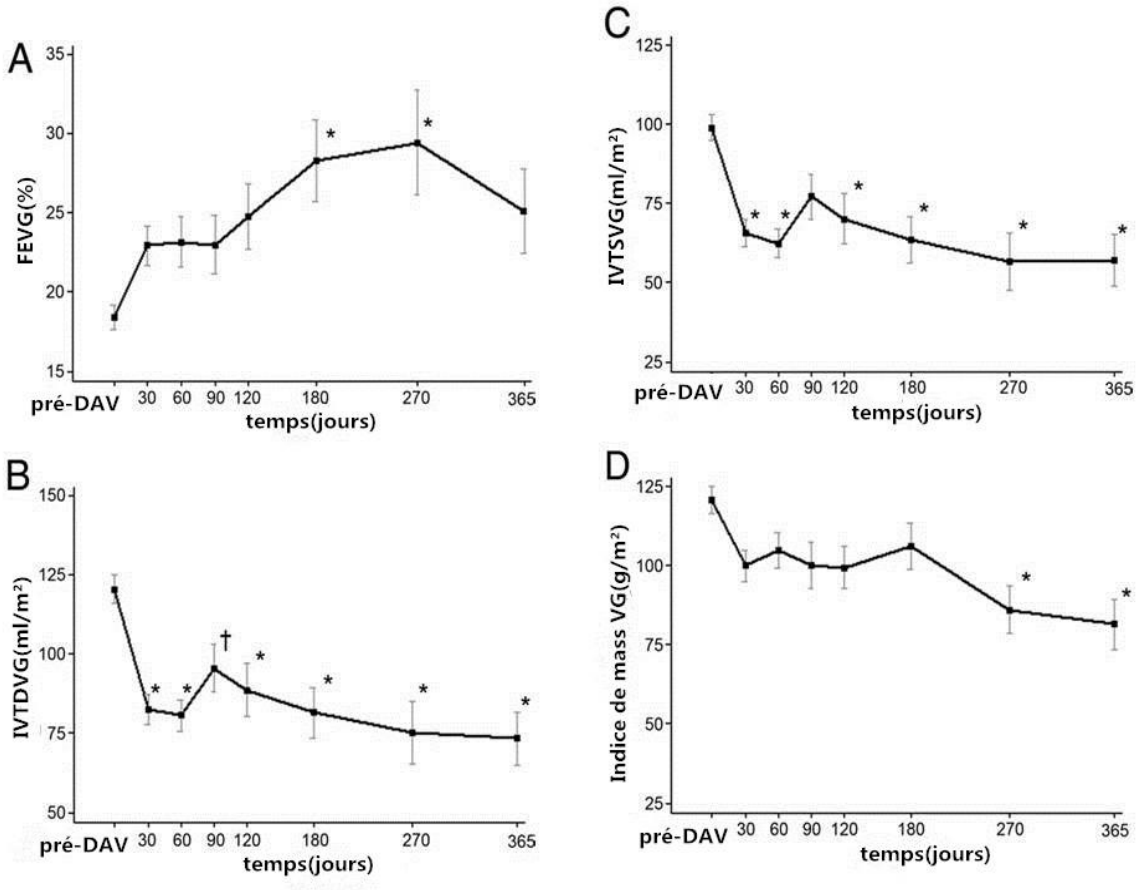


Figure 15: L'évolution morphologique et fonctionnelle cardiaque au fil du temps avec les DAVs.

A.FEVG, fraction d'éjection du ventricule gauche, DAV, dispositif d'assistance ventriculaire ; B. IVTSVG, Indice du volume télé-systolique du ventricule gauche (= volume télé-systolique du VG/ surface corporelle); C. IVTDVG,

Indice du volume télé-diastolique du ventricule gauche (= volume télé-diastolique du VG/surface corporelle) ; D. VG ; ventricule gauche (D'après Drakos[19] *et al. JACC 2013.*)

Dans notre étude, nous avons observé une atrophie plus substantielle des greffons complètement déchargés que des greffons partiellement déchargés. L'interprétation de ce constat pour l'application clinique est que la décharge ventriculaire adéquate et non excessive est convenable pour la récupération cardiaque. Comme précédemment indiqué dans l'introduction, il existe deux types de DAVs : DAVs pulsatiles et DAVs avec flux en continu. Il est généralement admis que les DAVs pulsatiles offrent une décharge ventriculaire plus profonde que les DAVs avec flux en continu. Le modèle de TCH cœur seul simule d'une certaine manière les DAVs pulsatiles et le modèle TCH cœur-poumon simule les DAVs avec flux en continu. La controverse subsiste : quel type de DAVs représente la meilleure approche dans le traitement de l'IC pour objectif „*bridge to recovery*"? Kato[149] *et al* ont rapporté que la décharge mécanique du myocarde défaillant avec les DAVs pulsatiles, comparés aux DAVs avec flux en continu, est plus efficace pour restaurer la fonction systolique/diastolique du VG ainsi que pour normaliser le BNP et les marqueurs des matrices extracellulaires. Il propose d'utiliser des DAVs pulsatiles chez les patients avec une IC avancée ayant notamment pour objectif „*Bridge to recovery*". Tandis que dans une étude clinique réalisée par Slaughter[145] *et al*, ils ont trouvé que les DAVs avec flux en continu, par rapport aux DAVs pulsatiles, améliorent significativement la survie des patients avec une IC avancée exempte d'AVC et du dysfonctionnement mécanique pendant un suivi de 2 ans. Les deux types de DAVs améliorent la qualité de vie et la capacité fonctionnelle des patients. Toutefois le critère d'évaluation primaire de cette étude est une survie exempte d'AVC et du dysfonctionnement mécanique, ce qui ne donnait pas d'information sur le „*Bridge to recovery*". D'après cette étude, mis à part des complications neurologiques et mécaniques, les deux types de DAVs apportent un effet bénéfique comparable sur la fonction cardiaque. Dans le protocole de Harefield[137], le Clenbuterol, un agoniste du récepteur β2-adrénergique qui induit une „hypertrophie cardiaque physiologique", serait inclus dans le liste de médicaments adjuvants chez les patients avec les DAVs pour compenser l'effet atrophique induit par les DAVs. Cette stratégie a prouvé l'amélioration significative du ratio du „*bridge to recovery*" avec 11 sur 15 patients ayant

bénéficié du sevrage de DAVs. Ceci prouve l'intérêt d'éviter l'atrophie excessive dans le traitement de l'IC avec les DAVs.

L'IC est caractérisée, indépendamment de son étiologie, par la fibrose interstitielle substantielle, y compris le dépôt excessif des protéines de la matrice extracellulaire, la hausse de la quantité et la modification des sous-types et de la réticulation des collagènes[13,195]. Ces changements augmentent la rigidité cardiaque et détériorent la contractilité et la relaxation. Cependant, l'effet de décharge ventriculaire sur le remodelage de la matrice extracellulaire reste un sujet de débat[195,196]. Quelques études cliniques et expérimentales[196,197] ont montré que la concentration et la réticulation des collagènes ainsi que la rigidité cardiaque sont accrues après la pose de DAVs, alors que d'autres études ont rapporté des résultats inverses[195]. Dans notre étude, nous avons montré que la quantité des collagènes totaux était augmentée dans le groupe TCH cœur seul comme dans le groupe TCH cœur-poumon, indépendamment de l'intensité de la décharge ventriculaire. Alors que les niveaux des enzymes impliqués dans le processus de renouvellement des collagènes tels que MMP-2 et MMP-9, ainsi que les cytokines inflammatoires (IL-1α, TGF-β, TNF-α, etc.) jouant probablement un rôle dans la fibrose, étaient comparables dans les deux types de greffons. Il n'y avait également aucune différence significative entre les greffons et les cœurs orthotopiques sur la concentration des molécules susmentionnées. Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation de la concentration des collagènes détectée dans les greffons est secondaire à l'atrophie cardiaque : la diminution de la taille des cardiomyocytes exagère la proportion des collagènes. Le renouvellement des collagènes et le processus fibrosant suite à l'inflammation ne sont pas les mécanismes principaux pour expliquer la fibrose des greffons dans cette condition-là.

Nous avons également découvert que la décharge mécanique conduit à une diminution significative du métabolisme du glucose qui est en revanche proportionnelle à l'intensité de décharge ; c'est à dire, plus importante la décharge ventriculaire est, moins de consommation du glucose les greffons ont. Bassingthzaighte[198] *et al*. ont émis l'hypothèse que le flux sanguin coronaire et la consommation des substrats énergiques et de l'oxygène soient régularisés par la concentration locale de l'adénosine triphosphate (ATP). Dans le contexte de décharge ventriculaire, la diminution du travail mécanique externe et de l'activité interne ionique induit une baisse de la consommation d'ATP et ultérieurement du métabolisme glucidique. Une autre

hypothèse a été émise qu'il y a un „switch" de substrats métaboliques dans la condition de décharge ventriculaire. Le stress pariétal du VG et la force de cisaillement imposée à l'endothélium dans le cœur déchargé sont diminués ; la libération d'oxyde nitrique et la glycolyse induite par l'oxyde nitrique sont ensuite réduites. Une étude précédente a montré que les enzymes métaboliques et les transporteurs du glucose (*Carnitine palmitoyltransferase I, GLUT4*) sont régularisés à la baisse quand le myocarde est déchargé.

En effet, notre étude a quelques limitations. Les résultats sont dérivés des greffons cardiaques murins non défaillants tandis que l'IC clinique consiste en une série de processus complexes physiopathologiques, y compris le dysfonctionnement cellulaire/tissulaire, l'inflammation chronique et l'altération de l'environnement neuro-hormonal qui jouent un rôle crucial dans le remodelage ventriculaire. L'atrophie du myocarde sain induite par la décharge mécanique doit être interprétée avec prudence pour l'application clinique. Comme mentionné ci-dessus, du point de vue de l'intensité de décharge, les modèles de TCH cœur seul et TCH cœur-poumon peuvent être comparés respectivement aux DAVs pulsatiles et aux DAVs avec flux en continu. Mais d'un point de vue des caractéristiques hémodynamiques, le modèle de TCH cœur-poumon diffère des DAVs avec flux en continu. Dans le modèle de TCH cœur-poumon, la pré-charge du greffon cœur-poumon est réduite mais la post-charge reste inchangée identique à celle du cœur orthotopique. Le greffon doit développer une pression intraventriculaire suffisante pour déclencher une éjection effective en vainquant la pression artérielle moyenne du receveur, tandis que les DAVs avec flux en continu diminuent la pré-charge comme la post-charge, donnant lieu à une décharge de volume et de pression du VG. L'ouverture de la valve aortique est occasionnellement observée chez les patients avec les DAVs.

En conclusion, notre étude confirme que la décharge de volume induite par les modèle de TCH conduit au remodelage cardiaque du greffon sain, y compris l'atrophie myocardique, la fibrose et la réduction du travail mécanique et du métabolisme glucidique. L'atrophie myocardique est l'effet direct et prédominant de la décharge mécanique. L'atrophie cardiaque fait augmenter la proportion des collagènes et est responsable de la dysfonction systolique/diastolique. Par rapport à la décharge complète, la décharge partielle est associée à une atrophie cardiaque moins profonde et une contractilité mieux préservée ; les greffons hétérotopiques présentent une fibrose et un trouble de relaxation indépendamment de l'intensité de décharge.

5. Conclusion et Perspectives

Nos études expérimentales nous ont menés à explorer les effets thérapeutiques de deux approches différentes mais éventuellement convergentes et synergétiques dans le traitement de l'IC chronique post-infarctus, notamment l'assistance biologique à base de cellules souches et l'assistance mécanique. L'objectif commun des deux approches est de réparer/restaurer la structure et la fonction cardiaque globale ; l'assistance biologique vise la zone infarcie tandis que l'assistance mécanique vise la zone éloignée de l'infarctus.

Nos études montrent que le mécanisme cellulaire principal sous-jacent de la réparation cardiaque à la base de CSMs est la favorisation de l'angiogénèse. Ainsi la perfusion sanguine dans la zone infarcie notamment la zone bordant le site d'injection est améliorée, tandis que la fonction cardiaque globale malgré un gain de perfusion après administration des CSMs reste inchangée. La perte des unités contractiles n'est donc pas corrigée avec l'injection de CSMs. En effet, actuellement, la transdifférenciation de CSMs en cardiomyocytes *in vivo* n'a pas été prouvée. Nous avons observé que le bénéfice sur la perfusion diminuait progressivement. Le phénomène est probablement lié à la perte, avec le temps, des CSMs en raison de l'apoptose ou de la mort cellulaire, ainsi la survie de CSMs est la condition *sine qua non* pour la thérapie cellulaire cardiaque.

Notre travail montre également que le préconditionnement de CSMs à l'hypoxie représente une méthode efficace pour promouvoir leur potentiel thérapeutique. La culture *in vitro* en hypoxie de CSMs améliore leur prolifération et maintient un état indifférencié sans induire de changement sur leur multipotence. L'étude *in vivo* montre que le préconditionnement avec l'hypoxie renforce leurs effets thérapeutiques sur la perfusion segmentaire, sur la contractilité intrinsèque et sur l'histologie tissulaire, mais aussi sur la diminution de l'infiltration inflammatoire, la diminution de fibrose et l'augmentation de néo-vaisseaux. Les mécanismes précis ne sont pas clairs. Il est généralement acquis que l'hypoxie régularise les processus cellulaires susmentionnés par l'intermédiaire de l'*hypoxia-induced factor 1* (HIF-1). L'hypoxie favorise la stabilisation et la translocation nucléaire du HIF-1 qui est ensuite combiné au *hypoxia response element* (HRE) situé dans les gènes cibles tels que le gène codant pour le VEGF et ceux codant pour les protéines impliqués dans les voies de signalisation régularisant la

prolifération (Oct4, cMet) et la sécrétion des facteurs paracrines (PI3K-Akt).

Nous avons réussi à établir deux modèles de TCH : la TCH cœur seul et TCH cœur-poumon pour simuler respectivement les DAVs déchargeant complétement le VG et ceux déchargeant partiellement le VG. Notre étude préalable sur l'assistance mécanique montre que la décharge ventriculaire donne lieu à plusieurs effets sur la structure et sur la fonction d'un cœur non défaillant, y compris l'atrophie et la fibrose du myocarde, la dysfonction systolo-diastolique et la diminution du métabolisme du glucose. Ces effets sont corrélés à l'intensité de la décharge ventriculaire. L'interprétation de ce constat pour la pratique clinique est que l'atrophie myocardique suite à une décharge ventriculaire trop intense empêche probablement la récupération fonctionnelle rendant difficile „*Bridge to recovery*". Un autre constat est que le métabolisme du glucose est exagérément diminué dans la condition de décharge mécanique, suggérant que le métabolisme cardiaque (substrats/enzymes) pourrait être une cible thérapeutique. La limitation de cette étude est que nous avons déchargé des cœurs sains au lieu des cœurs défaillants, ce qui diminue l'applicabilité de cette étude.

Pour conclure, notre travail vise à développer une approche thérapeutique innovante pour traiter l'IC ischémique chronique en abordant deux stratégies sous exploration intensive, i.e. la thérapie cellulaire pour réparer le myocarde souffrant de l'infarctus et la décharge mécanique pour protéger le myocarde éloigné de l'infarctus mais souffrant de la surcharge de pression/volume. La thérapie cellulaire avec des CSMs et le préconditionnement des cellules avec l'hypoxie jouent leurs rôles dans la réparation cardiaque principalement pour favoriser l'angiogénèse. Les effets essentiels de la décharge mécanique sont la régression de l'hypertrophie des cardiomyocytes et la restauration de l'énergétique cardiaque.

Nos perspectives de travail à long terme sont de poursuivre les deux stratégies thérapeutiques en approfondissant notre étude sur le plan mécanistique par les méthodologies d'analyse du protéome et du génome. En dehors de cela, quelques pistes peuvent être intéressantes pour nos études ultérieures :

5.1 Le marquage cellulaire pour tracer les cellules injectées *in vivo*, détecter leurs devenirs et mieux comprendre leur contribution relative dans la réparation cardiaque. Dans notre laboratoire, beaucoup d'efforts ont été consacrés pour trouver une technique fiable permettant le suivi des cellules injectées et surtout la détection de leur phénotype. Dans l'étude n°1, le

marquage à l'^{111}In nous a permis d'identifier la distribution des CSMs dans le cœur par rapport à la localisation de l'infarctus. Mais l'^{111}In a une demi-vie courte de 2,8 jours qui ne permet pas de suivre les cellules à long terme ; de plus, le marquage à l'isotope ne permet pas d'obtenir les données histologiques pour identifier précisément leurs phénotypes. Les marqueurs adaptés à l'examen immunohistochimi tels que le DAPI (4,6-diamidino-2-phynylindole), le GFP (green fluorescent protein) et le BrdU, etc, ont leurs propres défauts pour obtenir des données fiables. L'application des nanotechnologies dans le domaine de marquage cellulaire utilisant des particules métalliques détectables en IRM pourraient apporter des solutions dans le suivi des cellules transplantées.

5.2 Les cellules souches cardiaques (CSCs) sont-elles un meilleur candidat pour la thérapie cellulaire ? Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction et dans la discussion, actuellement, il n'y a pas de preuve montrant la transdifférenciation *in vivo* des cellules souches non cardiogéniques en cardiomyocytes. Pourtant la régénération des cardiomyocytes et du myocarde est l'objectif ultime de la thérapie cellulaire. Théoriquement, la découverte des cellules souches cardiaques (CSCs) telles que les c-kit+ CSCs, les Sca-1+ CSCs et les cellules dérivées des cardiosphères représente une opportunité pour promouvoir l'efficacité de la thérapie cellulaire.

5.3 L'application des modèles de TCH aux animaux pathologiques nous permet de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent du „bridge to recovery" et nous fournit un modèle plus pertinent simulant les DAVs. Dans ce cadre conceptuel, la TCH cœur seul et la TCH cœur-poumon seront réalisées chez les rat donneurs et receveurs avec cardiopathie ischémique induite par la ligature coronaire, nous allons observer la taille d'infarctus, la taille des cardiomyocytes, la concentration des collagènes totaux, le métabolisme du glucose et la fonction systolo-diastolique du cœur orthotopique, du cœur partiellement déchargé et du cœur complètement déchargé. Les constats nous permettront de connaître la contribution relative de la charge ventriculaire dans l'évolution de l'IC post-infarctus.

5.4 La combinaison de l'assistance biologique et l'assistance mécanique. Comme les deux stratégies ont leurs propres cibles et mécanismes thérapeutiques, la combinaison de ces deux stratégies peut conduire à un effet synergétique. De plus, la décharge mécanique favorise la survie et la intégration des cellules injectées par diminution du stress pariétal. En revanche, la

thérapie cellulaire renforce l'effet protecteur de la décharge mécanique à travers des facteurs paracrines.

6. Annexe

6.1 Prélèvement et culture des cellules souches mésenchymateuses (CSMs)

Procédures chirurgicales

1. Allumer le bain-marie de la salle de culture (37°C). Allumer les U.V. de la hotte.

2. Mettre à chauffer des tubes flacon de 15ml contenant 10 ml de PBS (1 par patte prélevée). Ajouter 0,15ml d'héparine dans le tube contenant du PBS.

3. Mettre à chauffer du milieu de culture complet.

4. Manip sur le rat:

- Anesthésier le rat à l‟isoflurane selon le protocole d‟anesthésie classique.
- Le placer sous le masque (pas besoin d‟intubation)
- Raser la région du tibia.
- Inciser la peau au niveau du tibia et l'isoler à l'aide d'une paire de pinces en prenant soin de ne pas casser l'os. Grater la surface du tibia à l'aide du scalpel.
- Perforer à l'aide d'une aiguille (ou de la fraise) la portion caudale du tibia.
- Aspirer à l'aide d'une seringue de 1ml contenant un peu de PBS hépariné la moelle à l'intérieur de l'os perforé.
- Répéter cette opération plusieurs fois en remettant les cellules en suspension dans le tube de PBS hépariné.
- Désinfecter la plaie avec de la Bétadine. Recoudre le rat (2 points). Injecter en intramusculaire 0,1 ml de clamoxyl. Le remettre dans sa cage.

6.2 La ligature coronaire

Anesthésie :

Les rats sont pré-anesthésiés dans le cage d'induction pendant 15 minutes avec le mélange de l'isoflurane (3,5 vol%) et l'oxygène (2L/min), après la vérification de la profondeur d'anesthésie, l'intubation oro-trachéale est ensuite réalisée. Les paramètres du respirateur sont réglés tels que suivant : fréquence respiratoire 60/min, volume courant = 2,5 mL. Le débit d'isoflurane est fixé à 3 vol% au début puis diminué à 2,5 vol% selon la réaction au pincement de la queue.

Procédures chirurgicales :

1. Les rats sont mis en décubitus latéral droit ; la patte supérieure gauche est attachée avec un fil vert et tirée en avant.
2. Raser le thorax et badigeonner avec la Bétadine.
3. Faire une incision de 2cm au scalpel 1cm du bord gauche de sternum au niveau de 5^{e} espace intercostale ; disséquer les muscles, pénétrer dans la pleuvre avec une paire de ciseaux.
4. Mettre un écarteur Beckman pour exposer le cœur.
5. Effectuer la péricardotomie. Identifier l'artère intraventriculaire antérieure (IVA).
6. Passer un point de suture autour de l'IVA proximale juste au-dessous de l'oreillette gauche avec le fil Prolène 7-0 et ligaturer cette artère.
7. Placer le drain au-dessus du cœur et refermer en 3 plans : côte, muscle, peau.
8. Avant de nouer le fil, retirer doucement le drain thoracique en aspirant avec une seringue de 20 mL pour évacuer de l'air dans le thorax. Faire une infiltration d'antalgique (Xylocaïne) dans la cicatrice.
9. Injecter l'antibiotique (Cefamandole) 10mg en intramusculaire
10. Couper l'isoflurane et sevrer le respirateur progressivement

6.3 Trois technique de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH) chez les rats

Matériel:

- Rats Lewis mâles (âges 2- 3 mois, poids 300-400g);
- Solution cardioplégique (Celsior, Panpharma, France), 10 ml dans une seringue de 20 ml×2, 10 ml dans un flacon ;
- Ciseaux de Mayo, ciseaux d‟ophtalmologie, ciseaux de microchirurgie, pince à griffes, pince courbée, pince Kelly, pince de microchirurgie, porte-aiguille ;
- Prolène 5-0, Viryl 2-0, tirette avec silicone blanc, clamps vasculaires jaunes, et verts
- Compresses, coton tige, scotch, rasoir, scalpel avec lame de 15, pousse-seringue, bol contenant de la glace pilée
- Héparine (300u /kg), cefamandole (50mg/kg), lidocaïne (2%)

Procédures chirurgicales du prélèvement de greffon cardiaque

1. Anesthésier les rats à l‟isoflurane avec intubation oro-trachéale.
2. Raser les rats et désinfecter la zone thoracique.
3. Injecter de l‟héparine (300u/kg) en intraveineux par la veine pénienne.
4. Faire une costotomie en „V‟(butterfly incision), faire la péricardotomie, disséquer les veines caves supérieures (VCS) gauche et droite, ainsi que la veine cave inférieure (VCI). Passer un fil Prolène 5-0 autour des vaisseaux.
5. Disséquer l‟aorte ascendante (AAsc) et passer un fil Viryl 2-0, faire entrer les deux extrémités dans la tirette en silicone qui servira ensuite de clamp aortique.
6. Charger le pousse-seringue avec la seringue de Celsior, régler le débit de perfusion à 60ml/h.
7. Ligaturer les VCSs et la VCI, faire une aortotomie partielle et introduire le cathéter connecté à la seringue de Celsior sans l„enfoncer dans le ventricule gauche (VG) ; serrer la tirette et administrer la solution cardioplégique ; éteindre le respirateur.
8. Faire une veinotomie sur la VCI pour décharger le cœur. Disséquer rapidement l‟artère pulmonaire (AP) et la couper juste avant la bifurcation.
9. Pendant la procédure de cardioplégie, masser doucement les cavités cardiaques pour éviter

qu‟elles soient distendues ; ajouter un autre nœud sur la VCS gauche et droite, transséquer les VCSs entre les deux nœuds.

10. A la fin de cardioplégie, enlever la tirette, compléter l‟aortotomie ; ajouter un nœud sur la VCI au-dessus de la veinotomie de décharge, couper la VCI entre les deux nœuds.
11. Disséquer la face postérieure du cœur et nouer les veines pulmonaires en bloc ; libérer le greffon en coupant le tissu au-dessous du nœud.
12. Rincer le greffon dans un pot avec l‟autre seringue de Celsior pour enlever le sang et éliminer les tissus gras.
13. Conserver le greffon dans un flacon de Celsior et le mettre dans la glace.

Procédures chirurgicales du prélèvement de greffon cœur-poumon

1. Anesthésier les rats à l‟isoflurane avec intubation oro-trachéale.
2. Raser les rats et désinfecter la zone thoracique.
3. Injecter de l‟héparine (300u/kg) en intraveineux par la veine pénienne.
4. Faire une costotomie en „V‟ (butterfly incision), faire la péricardotomie, disséquer les veines caves supérieures (VCS) gauche et droite, ainsi que la veine cave inférieure (VCI). Passer un fil Prolène 5-0 autour des vaisseaux.
5. Disséquer l‟aorte ascendante (AAsc) et passer un fil Viryl 2-0, faire entrer les deux extrémités dans la tirette en silicone qui servira ensuite de clamp aortique.
6. Charger le pousse-seringue avec la seringue de Celsior, régler le débit de perfusion à 60ml/h.
7. Ligaturer les VCSs et la VCI, faire une aortotomie partielle et introduire le cathéter connecté à la seringue de Celsior sans l‟enfoncer dans le ventricule gauche (VG) ; serrer la tirette et administrer la solution cardioplégique ; éteindre le respirateur.
8. Faire une veinotomie sur la VCI pour décharger le cœur.
9. Pendant la procédure de cardioplégie, masser doucement les cavités cardiaques pour éviter qu‟elles soient distendues ; ajouter un autre nœud sur la VCS gauche et droite, transséquer les VCSs entre les deux nœuds.
10. A la fin de cardioplégie, enlever la tirette, compléter l‟aortotomie ; ajouter un nœud sur la VCI au-dessus de la veinotomie de décharge, couper la VCI entre les deux nœuds.

11. Disséquer le bloc cœur-poumon en enlevant les ligaments et les tissus fibro-graisseux de bas vers le haut ; couper la trachée et libérer le greffon cœur-poumon.
12. Rincer le greffon dans un pot avec l'autre seringue de Celsior pour enlever le sang et le morceau de tissu gras.
13. Conserver le greffon dans un flacon de Celsior et le mettre dans les glaçons.

Procédures de réimplantation du greffon cardiaque dans l'abdomen (Figure 16)

1. Anesthésier les rats à l'isoflurane avec intubation oro-trachéale.
2. Raser les rats et désinfecter dans la zone abdominale ; l'opérateur s'installe à droite du rat.
3. Effectuer la laparotomie médiane ; bousculer sans extérioriser les intestins avec un coton tige pour exposer l'aorte abdominale (AoA) et la VCI.
4. Mettre deux compresses mouillées au bord de la laparotomie qui couvrent également les intestins, écarter les intestins avec 4 farabeufs pour obtenir un champ opératoire large.
5. Allumer le microscope et régler le grossissement à × 10 ; disséquer soigneusement l'AoA et la VCI pour qu'elles soient libres 1,5cm de longueur ; faire attention aux branches lombaires sur la face postérieure.
6. Passer 2 fils Viryl 2-0 aux extrémités du segment libéré et les mettre dans la tirette en silicone ; ajouter des clamps vasculaires aux branches lombaires si nécessaire.
7. Serrer la tirette distale puis proximale ; faire un trou sur l'AoAavec une aiguille de 28 gauges puis élargir l'aortomie à 8mm.
8. Sortir le greffon cardiaque du froid et l'emballer avec une bande de compresse humide et froide ; arroser le greffon avec du sérum physiologique froid toutes les 3 minutes pendant l'anastomose.
9. Préparer un morceau de fil Prolène 8-0 (5cm) ; orienter bien le greffon pour que l'AP soit au-dessus de l'AAsc ; commencer l'anastomose à l'extrémité distale de l'aortotomie ; faire deux nœuds puis continuer le surjet du côté de l'opérateur.
10. Quand le surjet arrive à l'autre extrémité de l'aortotomie, basculer le greffon vers l'opérateur puis continuer le surjet jusqu'à le point de départ ; nouer puis couper le fil ; retourner le greffon.
11. Faire un trou sur la VCI ; élargie la venotomie à 1cm avec les micro-ciseaux ; nettoyer la

lumière de VCI avec sérum physiologique et enlever des caillots si c'est le cas.

12. Commencer l'anastomose avec le reste du Prolène 8-0 ; faire le surjet dans le sens horaire sans basculer le greffon ; à la fin de surjet, nouer et couper le fil.

13. Enlever les clamps vasculaires ; lâcher la tirette distale ; vérifier qu'il n'y a pas de fuite importante ; puis lâcher la tirette proximale ; le greffon doit être bien perfusé avec une recoloration homogène et il commence à battre en peu de temps.

14. Quelquefois, le greffon présente une fibrillation ventriculaire et les oreillettes commencent à gonfler, il faut masser les oreillettes avec les coton-tiges. S'il saigne au niveau d'anastomose, comprimer avec un morceau d'éponge hémostatoque de type Tachosil.

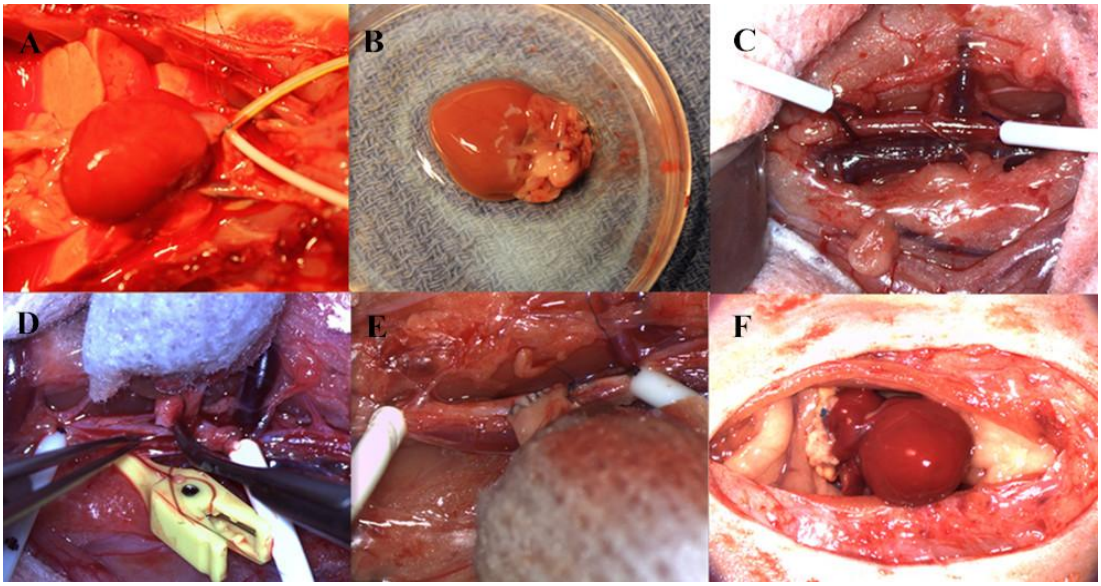


Figure 16: Les procédures de TCH cœur seul.

A, prélèvement du greffon cardiaque avec notre propre technique d'administration de la solution cardioplégique ; B, rinçage du greffon avec Celsior avant de mettre au froid ; C, dissection de l'aorte abdominale et la veine cave inférieure ; D, anastomose entre l'aorte abdominale du receveur et l'aorte ascendante du greffon ; E, basculer le greffon et continuer l'anastomose de l'autre côté ; F, l'aspect du greffon après le déclampage : recoloration homogène et bonne contractilité.

Procédures de réimplantation du greffon cœur-poumon dans l'abdomen

1. Anesthésier les rats à l'isoflurane avec intubation oro-trachéale.

2. Raser les rats et désinfecter à l'étage abdominal ; l'opérateur s'installe à droite du rat.

3. Effectuer la laparotomie médiane ; bousculer sans extérioriser les intestins avec le coton tige

pour exposer l'aorte abdominale (AoA) et la VCI.

4. Mettre deux compresses mouillées au bord de la laparotomie qui couvrent également les intestins, écarter les intestins avec4 farabeufs pour obtenir un champs opératoire large.

5. Allumer le microscope et régler le grossissement à × 10 ; disséquer soigeusement l'AoA et la VCI pour au'elles soient libres 1,5cm de longueur ; faire attention aux branches lombaires sur la face postérieure.

6. Passer 2 fils Viryl 2-0 aux extrémités du segment libéré et les mettre dans la tirette en silicone ; ajouter des clamps vasculaires aux branches lombaires si nécessaire.

7. Serrer la tirette distale puis proximale ; faire un trou sur l'AoA avec une aiguille de 28 gauges puis élargir l'aortomie à 8mm.

8. Sortir le greffon cœur-poumon du froid et l'emballer avec une bande de compresse humide et froide ; arroser le greffon avec du sérum physiologique froid toutes les 3 minutes pendant l'anastomosis.

9. Préparer un morceau de fil Prolène 8-0 (5cm) ; commencer l'anastomose à l'extrémité distale de l'aortotomie ; faire deux nœuds puis continuer le surjet du côté de l'opérateur.

10. Quand le surjet arrive à l'autre extrémité de l'aortotomie, basculer le greffon vers l'opérateur puis continuer le surjet jusqu'à le point de départ ; nouer puis couper le fil ; retourner le greffon.

11. Enlever les clamps vasculaires ; lâcher la tirette distale ; vérifier qu'il n'y a pas de fuite importante ; puis lâcher la tirette proximale ; le greffon doit être bien perfusé avec une recoloration homogène et il commence à battre dans peu de temps.

12. Quelquefois, le greffon présente une fibrillation ventriculaire et les oreillettes commencent à gongfler, il faut masser les oreillettes avec les coton-tiges. S'il saigne au niveau d'anastomose, comprimer avec un morceau d'éponge hémostatoque de type Tachosil.

<u>Procédures de transplantation cardique hétérotopique fémorale avec la technique 'cuff'</u>

(Figure 17)

1. Le prélèvement du greffon est pareil que celui pour la transplantation cardiaque hétérotopique abdominale.

2. Préparer les „cuffs" au froid : insérer le „cuff" femmelle en polyéthylène dans l'AAsc et l'AP,

dont le diamètre externe est à 2mm, le diamètre interne est à 1mm et la longueur est à 5mm ; fixer les „cuffs" femelles avec 2-3 points de Prolène 7-0.

3. Insérer un „cuff" mâle en polyéthylène (diamètre externe à 1mm, diamètre interne à 0,9mm et la longueur à 10mm) dans le „cuff" femelle.

4. Anesthésier les rats d'une manière classique avec intubation oro-trachéale.

5. Raser les rats et désinfecter la zone inguinale ; l'opérateur s'installe à droite du rat.

6. Faire une incision de 4cm dans l'aine, disséquer les tissus sous-cutanés pour créer un espace pour loger le greffon.

7. Disséquer et libérer l'artère fémorale (AF) et la veine fémorale (VF) ; injecter l'héparine (300u/kg) en intraveineuse par la veine pénienne.

8. Clamper ensemble la partie proximale des vaisseaux fémoraux ; ligaturer l'extrémité distale avec Prolène 6-0 et faire une incision sur l'AF et la VF ; nettoyer la lumière des vaisseaux avec sérum physiologique hépariné.

9. Sortir le greffon de la solution cardioplégique conservée au froid ; orienter le greffon pour que le sens des cuffs corresponde au sens des vaisseaux fémoraux.

10. Insérer les cuffs mâles dans les vaisseaux fémoraux pour que l'AAsc et l'AP du greffon soient liées à l'AF et la VF du receveur respectivement ; fixer les cuffs mâles et les vaisseaux fémoraux avec 2-3 points de Prolène 7-0.

11. Lâcher le clamp vasculaire et le greffon est reperfusé ; il doit présenter une recoloration homogène et une contractilité forte.

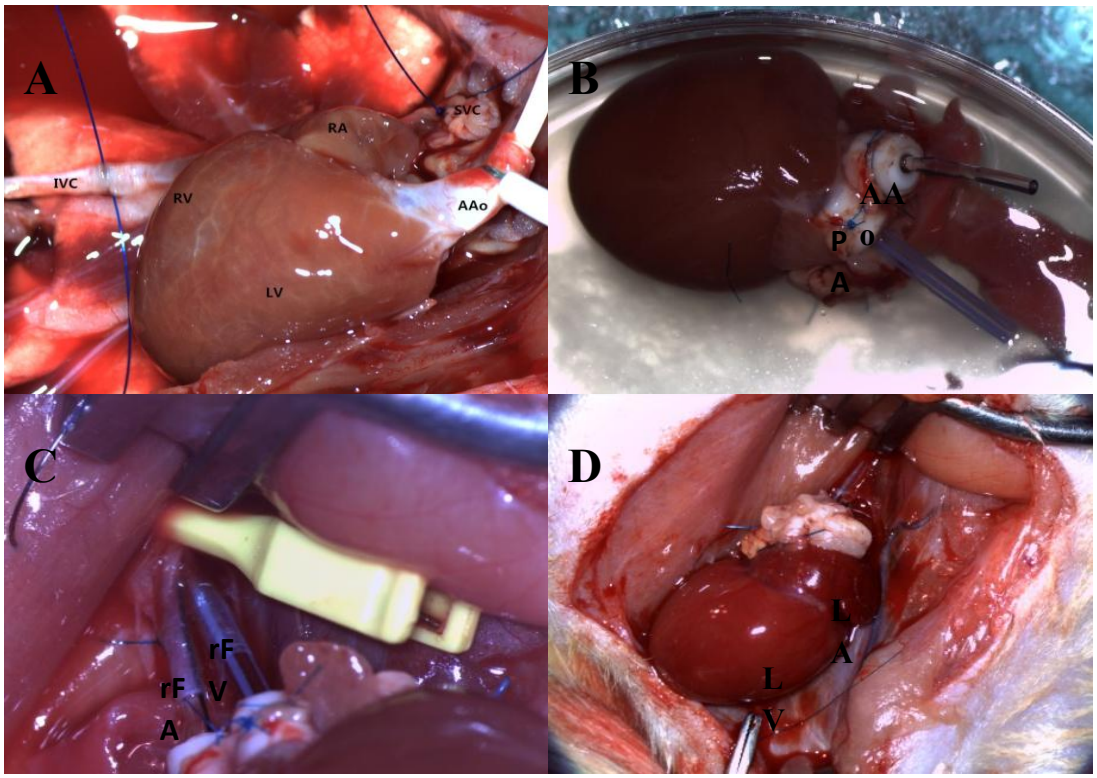


Figure 17: Les procédures de TCH fémorale avec cuff technique

A, le prélèvement du greffon ; B, la préparation du *cuff* ; C, brancher les *cuff* et les vaisseaux fémoraux ; D, après déclampage. AAo, l'aorte ascendante; LV, *left ventricle,* ventricule gauche; LA, *left atrium,* oreillette gauche; RV, *right ventricle,* ventricule droit; RA, *right atrium,* oreillette droite; SVC, *superior vena cava,* veine cave supérieure; IVC, *inferior vena cava,* veine cave inférieure; PA, *pulmonary artery,* artère pulmonaire; rFA, *right femoral artery,* l'artère fémorale droite; rFV, *right femoral vein,* veine fémorale droite.

6.4 Echocardiographie chez le rat

Généralité

Echocardiographie transthoracique est une technique fiable et reproductible pour évaluer la structure et la fonction du cœur natif ainsi que le greffon cardiaque d'une manière non-invasive. Au sein de notre laboratoire, l'acquisition et l'analyse des données échocardiographiques étaient réalisées avec un système d'échographie (Philips medical system, Best, the Netherland), qui est équipé d'un transducteur de fréquence à 14 MHz. Pendant l'examen sur le cœur natif, les rats étaient en position décubitus latéral gauche, tandis que les rats étaient en position dorsal pendant l'évaluation du greffon. Les rats sont rasés à l'endroit où le transducteur est placé pour faciliter la pénétration des ultrasons. Cet examen est réalisé chez les rats sous anesthésie générale légère par l'inhalation des gaz mélangés d'isoflurane (1,5-2 vol%) et d'oxygène (1,5L/min).

Les modes d'échocardiographie utilisés dans notre étude comprennent :

- *L'échocardiographie bidimensionnelle* (écho 2D). Un mode donne des images dynamiques sur l'écran en temps réel.

- *L'échocardiographie temps-mouvement* (écho TM) qui permet la mesure de la taille des cavités cardiaques, de l'épaisseur des parois en diastole et en systole.
- *Le doppler pulsé,* qui permet d'analyser un flux localisé. Dans ce mode, l'échantillon de mesure est positionné en se repérant sur l'image 2D et sur le flux couleur.
- *Le doppler à codage couleur*, qui donne quant à lui des renseignements immédiatement interprétables concernant les flux sanguins intracardiaques. Les flux colorés se superposent à l'image en 2D. Par convention, les flux s'approchant du transducteur sont codés en rouge, les flux s'éloignant du transducteur sont codés en bleu, tandis que les flux turbulents sont codés en mosaïque.

Les techniques d'enregistrement de l'échocardiogramme

- *Voie parasternale gauche*. Les rats sont en décubitus latérale gauche. Le transducteur est placé au 3^{e}-4^{e} espace intercostale gauche, près du sternum. On ajuste l'orientation du capteur en tournant pour obtenir une coupe selon le plus grand axe du cœur. Ensuite, en tournant le transducteur de 90 dégrée dans le sens horaire, on obtiendra une coupe petit axe. Pour standardiser la mesure, les images de „petite axe" est enregistrées au niveau du pilier mitral.
- *Voie apicale*. Le transducteur est placé au niveau de l'apex ventriculaire, repéré par le choc de pointe. On obtiendra une coupe des „4 cavités" dans laquelle sont visualisés les deux oreillettes et les deux ventricules.
- *Repère à l'aide de la palpation manuelle*. Les greffons abdominaux ou fémoraux sont libre au plan des anastomoses les premiers jours après la transplantation ; puis ils sont immobilisés progressivement par les adhérences mais d'une manière aléatoire. L'avantage est que les greffons sont logés dans un compartiment avec des tissus mous, qui permet de comprendre facilement leur location et leur orientation par la palpation manuelle. Le désavantage est que les anses grêles empêchent parfois de bien visualiser les structures cardiaques avec les coupes standards.

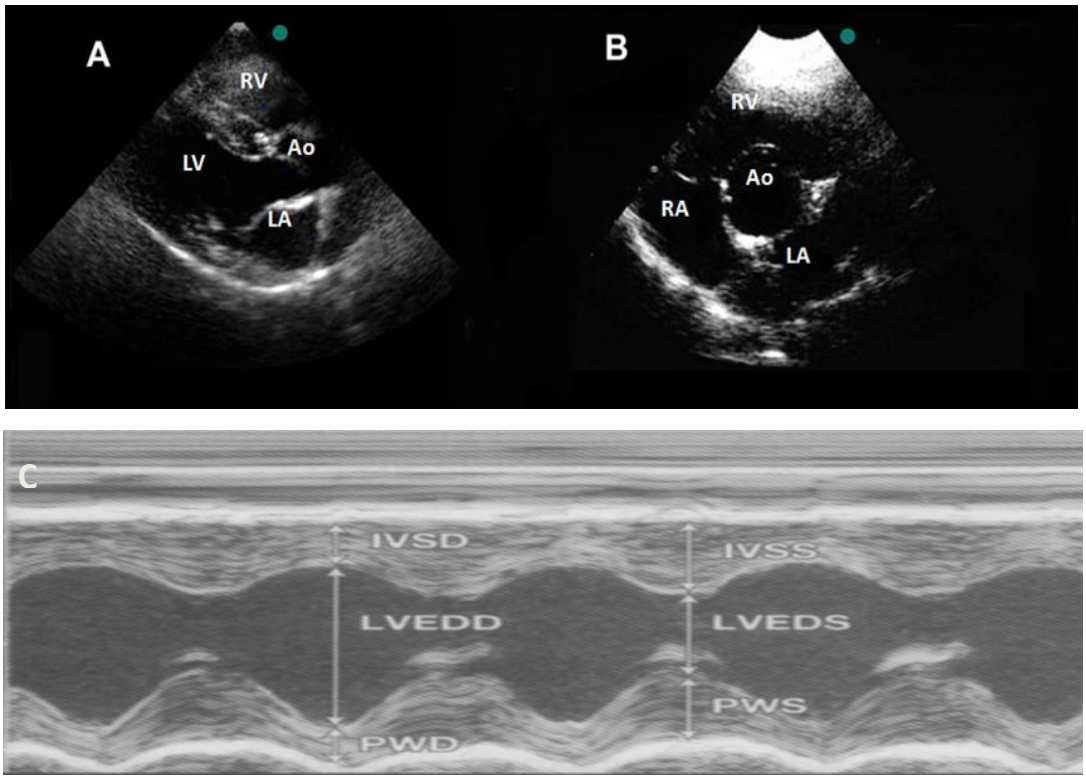


Figure 18: Echocardiographie avec coupes différentes.

A, écho 2D avec la coupe de grande axe par voie parasternale gauche ; B, écho 2D avec la coupe de petite axe au niveau basal ; C, écho TM avec la coupe de petite axe au niveau du pilier mitral. IVSD, l'épaisseur du septum intraventriculaire en diastole ; IVSS, l'épaisseur du septum intraventriculaire en systole ; LVEDD, la dimension télé-diastolique du ventricule gauche ; LVEDS, la dimension télé-systolique du ventricule gauche ; PWD, l'épaisseur diastolique de la paroi postérieure ; PWS, l'épaisseur systolique de la paroi postérieure. (D'après Abduch *et al.* Arq Bras Cardiol 2014).

La technique pratiquée dans notre étude

Dans notre étude, le mode TM en „petite axe" est le plus utilisé pour obtenir les paramètres quantitatives. Elles comprennent l'épaisseur du septum intraventriculaire en diastole, l'épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche (VG), la dimension du VG en systole et en diastole, la fraction d'éjection du VG et la fraction de raccourcissement du VG. Les autres modes et coupes permettent de détecter les situations pathologiques telles que la régurgitation valvulaire, la dilatation des cavités surtout les oreillettes ; et la thrombose intra-cavitaire qui sont assez fréquemment observées chez les greffons hétérotopiques.

6.5 Le cathéter de conductance pression-volume ventriculaire

L'utilisation du cathéter pression-volume à évaluer la fonction du greffon hétérotopique chez le rat (Figure 19)

Jusqu'à l'heure actuelle, le cathéter pression-volume est la méthode la plus puissante pour évaluer la fonction cardiaque, notamment il peut mesurer les paramètres non-volume dépendants. Pour évaluer la fonction du cœur transplanté du rat avec une location hétérotopique (cou, abdomen, cuisse, etc), la compétence du cathéter pression-volume est beaucoup limitée. Quel que soit le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique (TCH), travaillant ou non-travaillant, le ventricule gauche (VG) du greffon est rempli d'une façon non physiologique. Pour Le modèle travaillant de TCH, le VG est rempli soit par le retour du réseau coronaire, soit par la régurgitation aortique du greffon; tandis que pour le modèle non-travaillant de TCH, le VG est rempli par le retour des veines Thébésianne. Dans tous les deux circonstances, le volume du VG est beaucoup plus faible que celui du cœur in situ. Mais pour calculer le volume parallèle, il faut injecter de la saline hypertonique de faible volume pour changer la conductance sanguine le plus vite possible sans modifier l'hémodynamique, notamment la pression artérielle. Si le cathéter est dans le VG du greffon, et l'injection de saline est effectuée par la veine fémorale ou jugulaire, la modification de la conductance du sang dans le VG doit être très tardive, et l'amplitude doit être très faible. Le calcul de Vp sera erroné dans cette condition-là. C'est pareille pour faire l'occlusion de la veine cave inférieure pour calculer les paramètres non volume-dépendants. Ces désavantages limitent l'utilisation du cathéter pression-volume à évaluer la fonction du greffon cardiaque hétérotopique. Pourtant, il reste une technique intéressant pour mesurer la pression intra-VG et les paramètres pression-dérivés tels que le dP/dTmax et dP/dTmin, ainsi que la variation du volume pendant chaque cycle cardiaque.

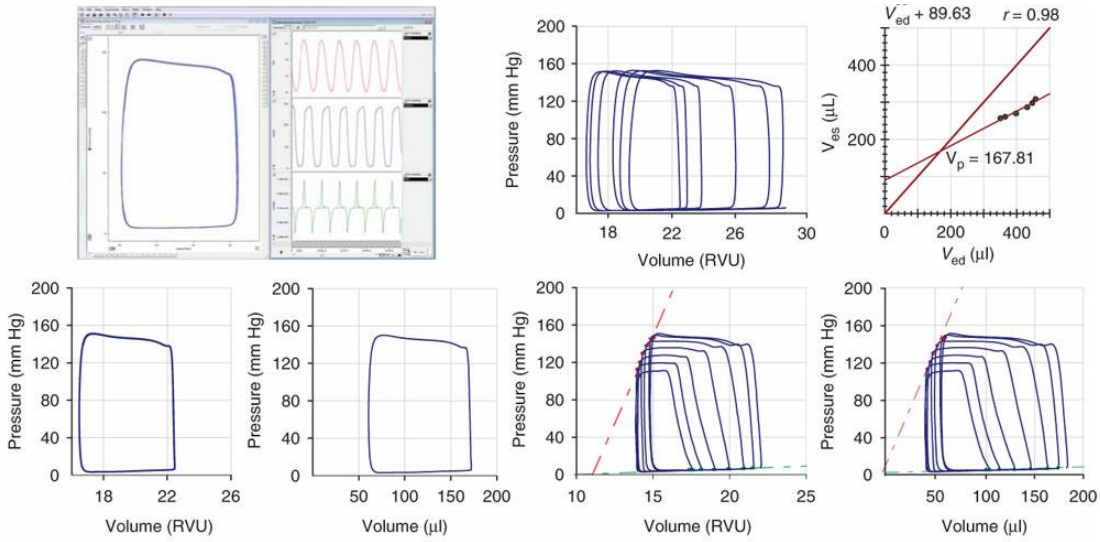


Figure 19: Les boucles de pression-volume obtenus par le cathéter de conductance.

Les schémas démontrent quelques boucles de pression-volume représentatifs à l'état de base. Le volume en RVU représente des résultats bruts, le volume en µl représente des résultats post-traitement (calibration avec les cuvettes standard).

Les procédures chirurgicales du cathétérisme

1. Tremper le cathéter pression-volume (p-v) dans la saline physiologique de 37°C pendant 30 min avant de débuter la manipulation.

2. L'induction et la maintenance d'anesthésie est réalisée avec l'isoflurane (2,0-3,5 vol%) *via* une sonde d'intubation trachéale connectée au respirateur (Minerve, Esternay, France). Les paramètres du respirateur sont réglés selon la formule suivante : le volume courant(ml)= 6,2 $M^{1,01}$(M= animal mass, kg) ; la fréquence respiratoire(/min)= 53,5×$M^{-0,26}$. Par exemple, chez un rat de 400g, le volume courant est à 2,457 mL et le fréquence respiratoire à 68/min. La profondeur d'anesthésie est surveillée et adaptée en fonction de la réaction au pincement de la queue.

3. Le cathéter pression-volume (p-v) peut être introduit dans le VG à travers l'artère carotidienne droite sans ouvrir le thorax (l'approche à thorax fermé) ou *via* un trou d'aiguille de 28-gauge à l'apex du cœur (l'approche à thorax ouvert). **NB**, pour l'approche à thorax fermé, c'est important de séparer l'artère carotidienne du nerf vague avant de ligaturer l'artère ; il ne faut pas pincer le cathéter p-v et les capteurs avec une pince ; il ne faut pas forcer à avancer le cathéter si l'on sent la résistance relative à la valve aortique, l'astuce est de retirer le cathéter et

de l‟avancer doucement en tournant. Pour l‟approche à thorax fermé, le cathéter est inséré d‟une manière rétrograde dans le VG ; quelques fois c‟est difficile de trouver la bonne position pour avoir des boucles rectangulaires sur le scope surtout chez les cœurs hétérotopiques qui sont atrophiques et les VGs sont de taille réduite ; il sera nécessaire d‟adapter la position du cathéter en fonction de l‟aspect des boucles et être sur que l‟électrode proximale est dans le VG. Il faut attendre la stabilisation des signaux pendant 10-15 min avant d‟enregistrer les boucles p-v de base.

4. La calibration du cathéter et l‟analyse des donnés. La calibration du cathéter et l‟analyse des données peuvent être réalisées avec l‟unité relative du volume (URV), avec des cuvettes remplies du sang hépariné dont les volumes absolus sont connus, avec la saline hypertonique ou avec la flux aortique. La calibration URV est une méthode intégrée par défaut dans le système Millar. Les donnés bruts sont enregistrés en URV. L‟analyse des URVs sans les convertir en volumes absolus peut être déjà informative dans plusieurs modèles pathologiques. La cuvette calibration permet de convertir les signaux enregistrés en URVs en volume absolu à l‟aide des puits dont le volume exacte est connu. Cependant, les volumes convertis sont toujours surestimé en raison de volume parallèle(V_p) dû au muscle cardiaque qui contribue aussi à la conductance calculé. La calibration avec saline hypertonique est réalisée pour déduire le V_p. En pratique, mettre en veille le respirateur pendant dizaine de secondes et injecter 20-40 µL de saline hypertonique (30%) pour obtenir un déplacement visible à droit des boucles p-v. Le V_p logistique est calculé par résoudre une équation linéaire pour localiser l‟intersection des deux lignes, l‟un représentée par l‟injection de saline hypertonique et l‟autre V_{es}= V_{ed} qui signifie l‟état extrême où le VG est privé de sang. En raison de variabilité possible, il sera nécessaire d‟effectuer 2-3 saline calibration pour chaque animal.

6.6 2-déoxy-2[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F-FDG) tomographie par émission de positron (TEP) chez le rat

Généralité

^{18}F-FDG TEP est une technique d'imagerie qui donne des images tomographiques et les informations quantitatives/qualitatives sur la viabilité ainsi que l'activité métabolique tissulaire avec la synchronisation des enregistrements sur le rythme cardiaque. Cette technique permet aussi de renseigner sur la contraction globale et la fonction du ventricule gauche. FDG est un analogue du glucose pris par les cellules viables comme dans la premier étape de métabolisme de glucose. La raison d'utiliser le FDG comme un traceur pour l'imagerie cardiaque est que les cardiomyocytes possèdent une activité glycolytique très élevée surtout au décours de l'hypoglycémie et lorsque l'insulinémie est élevée. Une zone présentant une viabilité altérée se révèle sur les images de TEP par un déficit de la captation de FDG dans cette zone. A l'inverse, une zone d'ischémie peut présenter une captation accrue en FDG en FDG (Shift vers la glycolyse anaérobie) .

Procédures de l'examen TEP

Prémédication des rats

Les rats sont mis à jeun la veille. Le jour de l'examen, ils reçoivent par gavage de l'acipimox (50mg/kg), un médicament qui inhibe la lipolyse endogène et provoque une baisse du taux d'acides gras dans le sérum pour faciliter la captation myocardique de glucose et améliorer la qualité des images en réduisant le rapport bruit/signal. Les rats sont anesthésiés par l'inhalation d'isoflurane sans intubation. La glycémie est contrôlée. Une activité moyenne de 70 MBq de FDG (IBA, Nancy, France) est ensuite injecté en intraveineux par la veine pénienne.

Acquisition des images

Une heure après l'injection de FDG, l'enregistrement des images est effectué avec le pareil de micro-TEP dédié aux petits animaux (Inveon, Siemens, Knoxville, TN ; USA). L'acquisition dure 10 minutes pour l'émission de ^{18}F, puis 6 minutes pour la transmission avec le ^{57}Co. La

fenêtre temporelle de coïncidence est réglée à 3,4 ns et la fenêtre énergique entre 350 et 650 keV.

Reconstruction des images

Les images sont reconstruits à l'aide d'un algorithme „3-D ordered subset expectation maximization"(OSEM-3D) avec les paramètres suivants : 4 itérations, 16 subsets, la matrice à 128 × 128, le zoom à 1,0 et l'épaisseur de coupe à 0,8 mm. Ces paramètres permettent d'obtenir des vexels de 0,8 × 0,4 × 0,4 mm et une résolution spatiale de moins de 1,5mm. Les valeurs segmentaires de captation du FDG sont déterminées avec le logiciel QPS (Siemens, Knoxville, TN, USA).

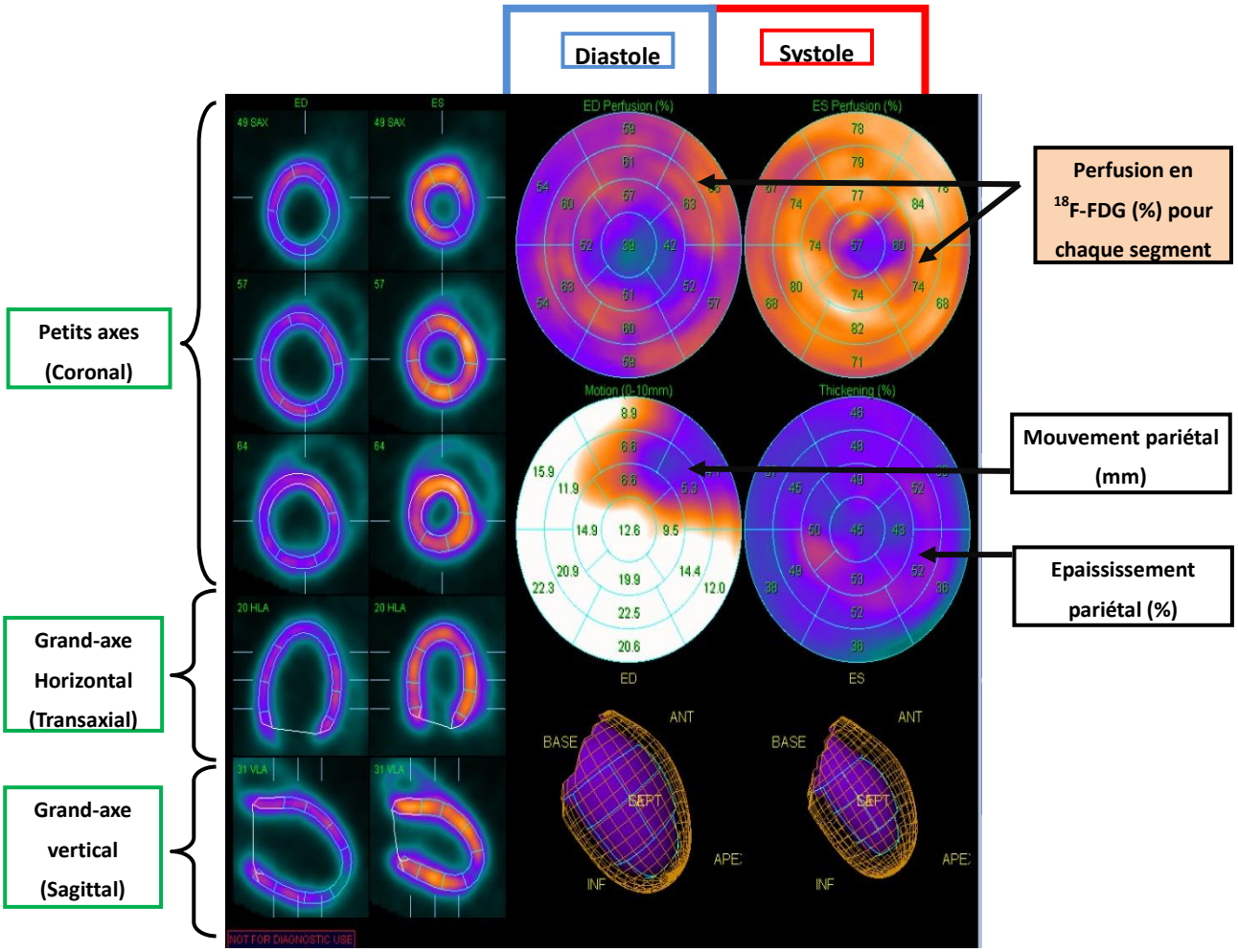


Figure 20: Résultats obtenus avec le 18F-FDG TEP : 1) la viabilité de chaque segment s'exprimant en fonction de l'activité en FDG exprimée en % du voxel ayant l'activité maximale et 2) la contractilité de chaque segment est évaluée en fonction du mouvement et de l'épaississement pariétaux.

Paramètres et interprétation (Figure 20)

L'imagerie par TEP permet d'obtenir les valeurs segmentaires de la captation du FDG, qui s'exprime en % du voxel ayant l'activité plus forte du FDG. Le cœur est réparti en 17 segments selon la segmentation du VG préconisée par *the American Heart Association*. Des segments présentant une captation du FDG inférieure à 50% sont considérés chez l'homme comme étant irréversiblement nécrotique. Nous avons adopté cette définition et au sein de notre laboratoire ; en plus, nous avons différencié des segments présentant une captation télé-systolique du FDG entre 50 et 70% et leur considéré comme des zones souffrant d'ischémie mais encore viable. Le TEP permet aussi d'obtenir le paramètre de contractilité qui est calculé selon l'augmentation (%) de l'épaisseur pariétale en télé-systole par rapport à celle en télé-diastole. L'enregistrement d'images synchronisées avec l'ECG permet d'acquérir les paramètres fonctionnels du VG tels que les volumes télé-diastolique et télé-systolique, ainsi que la fraction d'éjection.

7. Référence

1. Jacobs AK, Anderson JL, Halperin JL. The Evolution and Future of ACC/AHA Clinical Practice Guidelines: A 30-Year Journey A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation. 2014;130(14):1208‑17.

2. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left Ventricular Remodeling in Heart Failure. JACC Cardiovasc Imaging. janv 2011;4(1):98‑108.

3. González A, Ravassa S, Beaumont J, López B, Díez J. New Targets to Treat the Structural Remodeling of the Myocardium. J Am Coll Cardiol. oct 2011;58(18):1833‑43.

4. Michler RE. Stem cell therapy for heart failure. Methodist DeBakey Cardiovasc J. 2013;9(4):187.

5. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell Therapy for Heart Failure: A Comprehensive Overview of Experimental and Clinical Studies, Current Challenges, and Future Directions. Circ Res. 30 août 2013;113(6):810‑34.

6. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal Stem Cells: Biology, Pathophysiology, Translational Findings, and Therapeutic Implications for Cardiac Disease. Circ Res. 30 sept 2011;109(8):923‑40.

7. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. J Transl Med. 2014;12(1):260.

8. Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. Sci World J. 2013;2013:1‑12.

9. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. Cell Stem Cell. août 2010;7(2):150‑61.

10. Tang YL, Zhu W, Cheng M, Chen L, Zhang J, Sun T, et al. Hypoxic Preconditioning Enhances the Benefit of Cardiac Progenitor Cell Therapy for Treatment of Myocardial Infarction by Inducing CXCR4 Expression. Circ Res. 22 mai 2009;104(10):1209‑16.

11. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells. août 2008;26(8):2173‑82.

12. Rosen MR, Myerburg RJ, Francis DP, Cole GD, Marbán E. Translating Stem Cell Research to Cardiac Disease Therapies. J Am Coll Cardiol. sept 2014;64(9):922‑37.

13. Drakos SG, Terrovitis JV, Anastasiou-Nana MI, Nanas JN. Reverse remodeling during long-term mechanical unloading of the left ventricle. J Mol Cell Cardiol. sept 2007;43(3):231‑42.

14. Ambardekar AV, Buttrick PM. Reverse Remodeling With Left Ventricular Assist Devices: A Review of Clinical, Cellular, and Molecular Effects. Circ Heart Fail. 1 mars 2011;4(2):224‑33.

15. Chokshi A, Drosatos K, Cheema FH, Ji R, Khawaja T, Yu S, et al. Ventricular Assist Device Implantation Corrects Myocardial Lipotoxicity, Reverses Insulin Resistance, and Normalizes Cardiac Metabolism in Patients With Advanced Heart Failure. Circulation. 12 juin 2012;125(23):2844‑53.

16. Burkhoff D, Klotz S, Mancini DM. LVAD-Induced Reverse Remodeling: Basic and Clinical Implications for Myocardial Recovery. J Card Fail. avr 2006;12(3):227‑39.

17. Klotz S, Jan Danser AH, Burkhoff D. Impact of left ventricular assist device (LVAD) support on the cardiac reverse remodeling process. Prog Biophys Mol Biol. juin 2008;97(2-3):479‑96.

18. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. The Lancet. 2006;367(9507):356‑67.

19. Drakos SG, Wever-Pinzon O, Selzman CH, Gilbert EM, Alharethi R, Reid BB, et al. Magnitude and Time Course of Changes Induced by Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Unloading in Chronic Heart Failure. J Am Coll Cardiol. mai 2013;61(19):1985‑94.

20. Azad N, Lemay G. Management of chronic heart failure in the older population. J Geriatr Cardiol JGC. 2014;11(4):329.

21. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological Ventricular Remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2. Circulation. 23 juill 2013;128(4):388‑400.

22. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. Circulation. août 1985;72(2):406‑12.

23. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. Eur J Clin Invest. sept 2013;43(9):986‑95.

24. Nian M. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. Circ Res. 25 juin 2004;94(12):1543‑53.

25. Dorn GW. Novel pharmacotherapies to abrogate postinfarction ventricular remodeling. Nat Rev Cardiol. avr 2009;6(4):283‑91.

26. Frangogiannis N. The immune system and cardiac repair. Pharmacol Res. août 2008;58(2):88‑111.

27. Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and Spatial Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Following Myocardial Infarction: MMP and TIMP Functions Post-MI. Cardiovasc Ther. févr 2012;30(1):31‑41.

28. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. Cardiovasc Res. 15 févr 2006;69(3):604‑13.

29. Ratcliffe MB. Non-ischemic infarct extension: A new type of infarct enlargement and a potential therapeutic target*. J Am Coll Cardiol. 2002;40(6):1168‑71.

30. Kelley ST, Malekan R, Gorman JH, Jackson BM, Gorman RC, Suzuki Y, et al. Restraining Infarct Expansion Preserves Left Ventricular Geometry and Function After Acute Anteroapical Infarction. Circulation. 1 déc 1999;99(1):135‑42.

31. Jackson BM, Gorman JH, Moainie SL, Guy TS, Narula N, Narula J, et al. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 18 sept 2002;40(6):1160‑7; discussion 1168‑71.

32. Saeed M, Lee RJ, Weber O, Do L, Martin A, Ursell P, et al. Scarred myocardium imposes additional burden on remote viable myocardium despite a reduction in the extent of area with late contrast MR enhancement. Eur Radiol. avr 2006;16(4):827‑36.

33. French BA, Kramer CM. Mechanisms of postinfarct left ventricular remodeling. Drug Discov Today Dis Mech. sept 2007;4(3):185‑96.

34. Dobaczewski M, Akrivakis S, Nasser K, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Vascular mural cells in healing canine myocardial infarcts. J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc. août 2004;52(8):1019‑29.

35. Gilson WD, Epstein FH, Yang Z, Xu Y, Prasad K-MR, Toufektsian M-C, et al. Borderzone contractile dysfunction is transiently attenuated and left ventricular structural remodeling is markedly reduced following reperfused myocardial infarction in inducible nitric oxide synthase knockout mice. J Am Coll Cardiol. 30 oct 2007;50(18):1799‑807.

36. Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, et al. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. Circulation. 7 juin 2005;111(22):2935‑42.

37. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. J Cell Mol Med. mars 2002;6(1):1‑12.

38. Mann DL, McMurray JJV, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, et al. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). Circulation. 6 avr 2004;109(13):1594‑602.

39. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? Circulation. 6 avr 2004;109(13):1580‑9.

40. Yarbrough WM, Mukherjee R, Escobar GP, Mingoia JT, Sample JA, Hendrick JW, et al. Selective targeting and timing of matrix metalloproteinase inhibition in post-myocardial infarction remodeling. Circulation. 7 oct 2003;108(14):1753‑9.

41. Oi S, Haneda T, Osaki J, Kashiwagi Y, Nakamura Y, Kawabe J, et al. Lovastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat heart cells. Eur J Pharmacol. 2 juill 1999;376(1-2):139‑48.

42. 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. Circ Res. août 1997;81(2):187‑95.

43. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. Annu Rev Physiol. 2003;65:81‑101.

44. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer H-G. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. Cardiovasc Res. 1 août 2002;55(2):329‑40.

45. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, et al. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. Circulation. 23 mars 1999;99(11):1492‑8.

46. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science. 1 nov 1996;274(5288):782‑4.

47. Nakamura H, Takata S, Umemoto S, Matsuzaki M. [Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient heart following donor heart myocardial infarction: new insights into the pathological role of tumor necrosis factor-alpha from a novel heterotopic transplant-coronary ligation model]. J Cardiol. janv 2003;41(1):41‑2.

48. Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. Circulation. 4 févr 1997;95(3):693‑700.

49. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. J Clin Invest. nov 1993;92(5):2303‑12.

50. Engel D, Peshock R, Armstong RC, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. Am J Physiol Heart Circ Physiol. sept 2004;287(3):H1303‑11.

51. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. Circ Res. 23 juin 2000;86(12):1259‑65.

52. Sun M, Dawood F, Wen W-H, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, et al. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. Circulation. 16 nov 2004;110(20):3221‑8.

53. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. Circulation. 18 août 1998;98(7):699‑710.

54. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. J Am Coll Cardiol. 3 avr 2002;39(7):1229‑35.

55. Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, Inoue T, Kawano S, Kawamura N, et al. Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 1 mars 2007;73(4):794‑805.

56. Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, et al. Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. juill 2007;293(1):H743‑53.

57. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 15 mars 1996;87(6):2095‑147.

58. Guillén I, Blanes M, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. Am J Physiol. août 1995;269(2 Pt 2):R229‑35.

59. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Sammut IA, Suzuki N, Kaneda Y, et al. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. Circulation. 18 sept 2001;104(12 Suppl 1):I308‑I3.

60. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, et al. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. J Am Coll Cardiol. 1 nov 2001;38(5):1546‑53.

61. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. Am J Pathol. juill 2008;173(1):57‑67.

62. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. Circulation. 2 févr 1999;99(4):546‑51.

63. Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, et al. Cardiotrophin-1

(CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. Cardiovasc Res. mars 2002;53(4):902‑10.

64. Freed DH, Cunnington RH, Dangerfield AL, Sutton JS, Dixon IMC. Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart. Cardiovasc Res. 1 mars 2005;65(4):782‑92.

65. Zou Y, Takano H, Mizukami M, Akazawa H, Qin Y, Toko H, et al. Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. Circulation. 12 août 2003;108(6):748‑53.

66. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Guriel JL, Sugawara T, et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. déc 2000;14(15):2525‑31.

67. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. Adv Immunol. 1994;56:1‑26.

68. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. J Clin Invest. nov 1995;96(5):2304‑10.

69. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. J Immunol Baltim Md 1950. 1 sept 2000;165(5):2798‑808.

70. Yang Z, Zingarelli B, Szabó C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. Circulation. 7 mars 2000;101(9):1019‑26.

71. Zymek P, Nah D-Y, Bujak M, Ren G, Koerting A, Leucker T, et al. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. Cardiovasc Res. 1 mai 2007;74(2):313‑22.

72. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. J

Dermatol Sci. août 2004;35(2):83‑92.

73. Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. Microsc Res Tech. 15 févr 2001;52(4):354‑62.

74. Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J. Proteolytic control of growth factor availability. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. janv 1999;107(1):80‑5.

75. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. Cytokine Growth Factor Rev. juin 2000;11(1-2):59‑69.

76. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. Growth Factors Chur Switz. 1988;1(1):91‑9.

77. Deten A, Hölzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. J Mol Cell Cardiol. juin 2001;33(6):1191‑207.

78. Hao J, Wang B, Jones SC, Jassal DS, Dixon IM. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol. déc 2000;279(6):H3020-30.

79. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. Cardiovasc Res. 1 mai 2007;74(2):184-95.

80. Bassols A, Massagué J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. J Biol Chem. 25 févr 1988;263(6):3039-45.

81. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. EMBO J. juill 1987;6(7):1899-904.

82. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell. 13 juin 2003;113(6):685-700.

83. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. Int J Exp Pathol. avr 2004;85(2):47-64.

84. Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, Haspel R, Takayama K, Chen Z, et al. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. Circ Res. 19 mars 2004;94(5):601-8.

85. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, et al. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. J Am Coll Cardiol. 1 mai 2002;39(9):1468-74.

86. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, et al. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. Circulation. 6 nov 2007;116(19):2127-38.

87. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. Circulation. mars 1976;53(3 Suppl):I204-6.

88. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NAF, Gurbel PA, Sheehan F, HALT-MI Investigators. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. J Am Coll Cardiol. 2 oct 2002;40(7):1199-204.

89. Bujak M, Kweon HJ, Chatila K, Li N, Taffet G, Frangogiannis NG. Aging-related defects are associated with adverse cardiac remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 8 avr 2008;51(14):1384-92.

90. Frangogiannis NG. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. Curr Med Chem. 2006;13(16):1877-93.

91. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in

cardiac hypertrophy and failure. Circ Res. 7 févr 2003;92(2):139-50.

92. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. Circ Res. 4 févr 2005;96(2):151-63.

93. Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, et al. Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts. Stem Cells Dayt Ohio. mars 2007;25(3):589-601.

94. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. Nat Biotechnol. juill 2005;23(7):845-56.

95. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin J-T, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. Proc Natl Acad Sci U S A. 24 juin 2003;100(13):7808-11.

96. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 5 avr 2001;410(6829):701-5.

97. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. Nature. 8 avr 2004;428(6983):668-73.

98. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. Nature. 8 avr 2004;428(6983):664-8.

99. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. févr 2007;4 Suppl 1:S21-6.

100. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 30 nov 2007;131(5):861-72.

101. Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, Xi J, Fatima A, Nguemo F, et al. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2009;24(1-2):73-86.

102. Ma T, Xie M, Laurent T, Ding S. Progress in the reprogramming of somatic cells. Circ Res. 1 févr 2013;112(3):562-74.

103. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol. févr 1961;9:493-5.

104. Buckingham M, Montarras D. Skeletal muscle stem cells. Curr Opin Genet Dev. août 2008;18(4):330-6.

105. Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N, et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. Ann Thorac Surg. mars 2004;77(3):1121-30.

106. Menasché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. Lancet. 27 janv 2001;357(9252):279-80.

107. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. Eur Heart J. 2 mai 2011;32(10):1197-206.

108. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. Cardiology. 2009;113(3):155-60.

109. Kawashima I, Zanjani ED, Almaida-Porada G, Flake AW, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. Blood. 15 mai 1996;87(10):4136-42.

110. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. Nat Med. déc 1996;2(12):1329-37.

111. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 2 avr 1999;284(5411):143-7.

112. Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. Int J Hematol. déc 2005;82(5):371-6.

113. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. Ann N Y Acad Sci. juin 2001;938:221‑ 9; discussion 229-30.

114. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell. 19 sept 2003;114(6):763-76.

115. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. Circ Res. 29 oct 2004;95(9):911-21.

116. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 mars 2005;102(10):3766-71.

117. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. Circulation. 21 mars 2006;113(11):1451-63.

118. Anversa P, Rota M, Urbanek K, Hosoda T, Sonnenblick EH, Leri A, et al. Myocardial aging--a stem cell problem. Basic Res Cardiol. nov 2005;100(6):482-93.

119. Lanza R, Moore MAS, Wakayama T, Perry ACF, Shieh J-H, Hendrikx J, et al. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation. Circ Res. 2 avr 2004;94(6):820-7.

120. D"Alessandro DA, Kajstura J, Hosoda T, Gatti A, Bello R, Mosna F, et al. Progenitor cells

from the explanted heart generate immunocompatible myocardium within the transplanted donor heart. Circ Res. 20 nov 2009;105(11):1128-40.

121. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. Circulation. 20 févr 2007;115(7):896-908.

122. Eliasson P, Jönsson J-I. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. J Cell Physiol. janv 2010;222(1):17-22.

123. Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. J Cell Physiol. sept 2009;220(3):562-8.

124. Silván U, Díez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silió M, Aréchaga J. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. Differ Res Biol Divers. oct 2009;78(2-3):159-68.

125. Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Oxygen, a source of life and stress. FEBS Lett. 31 juill 2007;581(19):3582-91.

126. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. Nat Rev Mol Cell Biol. avr 2008;9(4):285-96.

127. Yu D-Y, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. Exp Eye Res. juin 2005;80(6):745-51.

128. Liu L, Simon MC. Regulation of transcription and translation by hypoxia. Cancer Biol Ther. juin 2004;3(6):492-7.

129. Wouters BG, van den Beucken T, Magagnin MG, Koritzinsky M, Fels D, Koumenis C. Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. Semin Cell Dev Biol. oct 2005;16(4-5):487-501.

130. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al. Reduced

adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. Diabetes. mars 2009;58(3):718-25.

131. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. Blood. 1 janv 2002;99(1):394.

132. Lee SH, Lee YJ, Song CH, Ahn YK, Han HJ. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways. Am J Physiol Cell Physiol. avr 2010;298(4):C847-56.

133. Hung S-C, Pochampally RR, Hsu S-C, Sanchez C, Chen S-C, Spees J, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. PloS One. 2007;2(5):e416.

134. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol J-P, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. Bone. avr 2007;40(4):1078-87.

135. Annabi B, Lee Y-T, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. Stem Cells Dayt Ohio. 2003;21(3):337-47.

136. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell. 10 avr 2008;2(4):313-9.

137. Birks EJ. Molecular Changes After Left Ventricular Assist Device Support for Heart Failure. Circ Res. 30 août 2013;113(6):777-91.

138. Drakos SG, Kfoury AG, Selzman CH, Verma DR, Nanas JN, Li DY, et al. Left ventricular assist device unloading effects on myocardial structure and function: current status of the field and call for action: Curr Opin Cardiol. mai 2011;26(3):245-55.

139. Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Entman ML, Noon GP, Torre-Amione G, et al.

MECHANISMS OF DISEASE Mechanisms of disease. The Lancet. 2002;9(2):935.

140. Levin HR, Oz MC, Catanese KA, Rose EA, Burkhoff D. Transient normalization of systolic and diastolic function after support with a left ventricular assist device in a patient with dilated cardiomyopathy. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. août 1996;15(8):840-2.

141. Mancini D, Goldsmith R, Levin H, Beniaminovitz A, Rose E, Catanese K, et al. Comparison of exercise performance in patients with chronic severe heart failure versus left ventricular assist devices. Circulation. 22 sept 1998;98(12):1178-83.

142. Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M, et al. Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. N Engl J Med. 2 nov 2006;355(18):1873-84.

143. Khan T, Delgado RM, Radovancevic B, Torre-Amione G, Abrams J, Miller K, et al. Dobutamine stress echocardiography predicts myocardial improvement in patients supported by left ventricular assist devices (LVADs): hemodynamic and histologic evidence of improvement before LVAD explantation. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. févr 2003;22(2):137-46.

144. Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, Lafuente JA, Roberts RR, Akgul A, et al. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. J Surg Res. janv 2005;123(1):25-32.

145. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, et al. Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. N Engl J Med. 2009;361(23):2241-51.

146. Garatti A, Bruschi G, Colombo T, Russo C, Lanfranconi M, Milazzo F, et al. Clinical outcome and bridge to transplant rate of left ventricular assist device recipient patients: comparison between continuous-flow and pulsatile-flow devices. Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg. août 2008;34(2):275-80; discussion 280.

147. Bartoli CR, Giridharan GA, Litwak KN, Sobieski M, Prabhu SD, Slaughter MS, et al. Hemodynamic responses to continuous versus pulsatile mechanical unloading of the failing left ventricle. ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992. oct 2010;56(5):410-6.

148. Radovancevic B, Vrtovec B, de Kort E, Radovancevic R, Gregoric ID, Frazier OH. End-organ function in patients on long-term circulatory support with continuous- or pulsatile-flow assist devices. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. août 2007;26(8):815-8.

149. Kato TS, Chokshi A, Singh P, Khawaja T, Cheema F, Akashi H, et al. Effects of Continuous-Flow Versus Pulsatile-Flow Left Ventricular Assist Devices on Myocardial Unloading and Remodeling. Circ Heart Fail. 1 sept 2011;4(5):546-53.

150. Kadner A, Chen RH, Adams DH. Heterotopic heart transplantation: experimental development and clinical experience. Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg. avr 2000;17(4):474-81.

151. Michler RE, McManus RP, Smith CR, Sadeghi AN, Rose EA. Technique for primate heterotopic cardiac xenotransplantation. J Med Primatol. 1985;14(6):357‐62.

152. Minanov OP, Kwiatkowski P, Popilskis S, Michler RE. Modified technique for heterotopic heart transplantation in small primates. Ann Thorac Surg. janv 1997;63(1):258-60.

153. Abbott CP, Lindsey ES, Creech O, Dewitt CW. A TECHNIQUE FOR HEART TRANSPLANTATION IN THE RAT. Arch Surg Chic Ill 1960. oct 1964;89:645-52.

154. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. févr 1969;57(2):225-9.

155. Galiñanes M, Hearse DJ. Metabolic, functional, and histologic characterization of the heterotopically transplanted rat heart when used as a model for the study of long-term recovery from global ischemia. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. févr 1991;10(1 Pt 1):79-91.

156. Klein I, Samarel AM, Welikson R, Hong C. Heterotopic cardiac transplantation decreases the capacity for rat myocardial protein synthesis. Circ Res. avr 1991;68(4):1100-7.

157. Spencer AU, Hart JP, Cabreriza SE, Rabkin DG, Weinberg AD, Spotnitz HM. Aortic regurgitation in the heterotopic rat heart transplant: effect on ventricular remodeling and diastolic function. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. août 2003;22(8):937-45.

158. Tang-Quan KR, Bartos J, Deuse T, Churchill E, Schäfer H, Reichenspurner H, et al. Non-volume-loaded heart provides a more relevant heterotopic transplantation model. Transpl Immunol. mai 2010;23(1-2):65-70.

159. Wen P, Wang X, Li T, Zhang B, Sun X, Qiu G, et al. Establishment of a novel volume-loaded heterotopic heart transplantation model in rats. J Surg Res. juill 2013;183(1):435-41.

160. Mizuno T, Weisel RD, Li R-K. Reloading the heart: A new animal model of left ventricular assist device removal. J Thorac Cardiovasc Surg. juill 2005;130(1):99-106.

161. Ibrahim M, Navaratnarajah M, Kukadia P, Rao C, Siedlecka U, Cartledge JE, et al. Heterotopic abdominal heart transplantation in rats for functional studies of ventricular unloading. J Surg Res. janv 2013;179(1):e31-9.

162. Chi N-H, Yang M-C, Chung T-W, Chen J-Y, Chou N-K, Wang S-S. Cardiac repair achieved by bone marrow mesenchymal stem cells/silk fibroin/hyaluronic acid patches in a rat of myocardial infarction model. Biomaterials. août 2012;33(22):5541-51.

163. Tsai C-C, Yew T-L, Yang D-C, Huang W-H, Hung S-C. Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. Am J Blood Res. 2012;2(3):148.

164. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. BMC Cell Biol. 2011;12(1):12.

165. Boyette LB, Creasey OA, Guzik L, Lozito T, Tuan RS. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Display Enhanced Clonogenicity but Impaired Differentiation With Hypoxic Preconditioning. Stem Cells Transl Med. 1 févr 2014;3(2):241-54.

166. Pourrajab F, Forouzannia SK, Tabatabaee SA. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. Int J Cardiol. févr 2013;163(2):125-31.

167. Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, et al. Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. AJP Heart Circ Physiol. 28 mars 2008;294(5):H2002-11.

168. Siegel G, Krause P, Wöhrle S, Nowak P, Ayturan M, Kluba T, et al. Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Express Cardiomyogenic Proteins But Do Not Exhibit Functional Cardiomyogenic Differentiation Potential. Stem Cells Dev. sept 2012;21(13):2457-70.

169. Takehara N, Matsubara H. Cardiac regeneration therapy: connections to cardiac physiology. AJP Heart Circ Physiol. 1 déc 2011;301(6):H2169-80.

170. Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandenwijngaert S, et al. Differential Effects of Progenitor Cell Populations on Left Ventricular Remodeling and Myocardial Neovascularization After Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol. mai 2010;55(20):2232-43.

171. Duran JM, Makarewich CA, Sharp TE, Starosta T, Zhu F, Hoffman NE, et al. Bone-Derived Stem Cells Repair the Heart After Myocardial Infarction Through Transdifferentiation and Paracrine Signaling Mechanisms. Circ Res. 16 août 2013;113(5):539-52.

172. Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ Res. 21 nov 2008;103(11):1204-19.

173. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. Circulation. 30 mars 2004;109(12):1543-9.

174. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. Circ Res. 19 mars 2004;94(5):678-85.

175. Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. avr 2006;20(6):661-9.

176. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell. déc 2007;6(6):745-57.

177. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. Cell Death Differ. mai 2012;19(5):743-55.

178. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. BMC Cell Biol. 2010;11:11.

179. Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine. Cell Stem Cell. 6 avr 2012;10(4):362-9.

180. Raheja LF, Genetos DC, Yellowley CE. The effect of oxygen tension on the long-term osteogenic differentiation and MMP/TIMP expression of human mesenchymal stem cells. Cells Tissues Organs. 2010;191(3):175-84.

181. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. Nat Rev Genet. mars 2012;13(3):189-203.

182. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton‟s jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. Int J Biol Sci. 2010;6(5):499-512.

183. Jin J, Zhao Y, Tan X, Guo C, Yang Z, Miao D. An improved transplantation strategy for mouse mesenchymal stem cells in an acute myocardial infarction model. PloS One. 2011;6(6):e21005.

184. Liu H, Liu S, Li Y, Wang X, Xue W, Ge G, et al. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in the therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for renal ischemia/reperfusion injury. PloS One. 2012;7(4):e34608.

185. Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S, Blanco FJ. Effects of Severe Hypoxia on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation Potential. Stem Cells Int. 2013;2013:1-11.

186. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. Stem Cells Dayt Ohio. mai 2007;25(5):1166-77.

187. Silvestre J-S, Smadja DM, Levy BI. Postischemic Revascularization: From Cellular and Molecular Mechanisms to Clinical Applications. Physiol Rev. 1 oct 2013;93(4):1743-802.

188. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, Moon J-H, Lee G, Park G, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF-β/SMAD2 and PI3K/Akt pathways. Int J Mol Sci. 2014;15(1):605-28.

189. Tran N, Li Y, Maskali F, Antunes L, Maureira P, Laurens M-H, et al. Short-term heart retention and distribution of intramyocardial delivered mesenchymal cells within necrotic

or intact myocardium. Cell Transplant. 2006;15(4):351-8.

190. Levin HR, Oz MC, Chen JM, Packer M, Rose EA, Burkhoff D. Reversal of chronic ventricular dilation in patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading. Circulation. 1 juin 1995;91(11):2717-20.

191. Pokornỳ M, Červenka L, Netuka I, Pirk J, Koňařik M, Malỳ J, et al. Ventricular assist devices in heart failure: how to support the heart but prevent atrophy? Physiol Res Sci Bohemoslov. 2014;63(2):147-56.

192. Cao DJ, Jiang N, Blagg A, Johnstone JL, Gondalia R, Oh M, et al. Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. J Am Heart Assoc. 2013;2(2):e000016.

193. Soppa GKR, Lee J, Stagg MA, Felkin LE, Barton PJR, Siedlecka U, et al. Role and possible mechanisms of clenbuterol in enhancing reverse remodelling during mechanical unloading in murine heart failure. Cardiovasc Res. 12 déc 2007;77(4):695-706.

194. Xu R, Lin F, Zhang S, Chen X, Hu S, Zheng Z. Signal pathways involved in reverse remodeling of the hypertrophic rat heart after pressure unloading. Int J Cardiol. sept 2010;143(3):414-23.

195. Maybaum S, Kamalakannan G, Murthy S. Cardiac Recovery During Mechanical Assist Device Support. Semin Thorac Cardiovasc Surg. sept 2008;20(3):234-46.

196. Klotz S. Mechanical Unloading During Left Ventricular Assist Device Support Increases Left Ventricular Collagen Cross-Linking and Myocardial Stiffness. Circulation. 11 juill 2005;112(3):364-74.

197. Muranaka H, Marui A, Tsukashita M, Wang J, Nakano J, Ikeda T, et al. Prolonged mechanical unloading preserves myocardial contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis. J Thorac Cardiovasc Surg. oct 2010;140(4):916-22.

198. Bassingthwaighte JB, Li Z. Heterogeneities in myocardial flow and metabolism: exacerbation with abnormal excitation. Am J Cardiol. 1999;83(12):7-12.